

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program:

Speciální chemicko-biologické obory

Studijní obor:

Molekulární biologie a biochemie organismů



Michal Mrkáček

Histonové modifikace a methylace polyomavirových genomů
v průběhu infekce

Histone modifications and methylation of polyomaviral genomes
during the infection

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Jitka Forstová, CSc.

Praha, 2016

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 19. 8. 2016

Podpis

Tímto bych rád poděkoval celé své rodině za velikou podporu, kterou mi poskytli během mého studia biologie na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovi v Praze. Speciální poděkování bych pak rád věnoval svému školiteli, doc. RNDr. Jitce Forstové, CSc., za veškeré cenné rady a připomínky poskytnuté při psaní této práce.

Abstrakt

Podobně jako všechny ostatní viry tak i polyomaviry vyžadují pro svou úspěšnou reprodukci proteiny a enzymy kódované jejich hostitelskými buňkami. Kromě toho, vzhledem k jejich relativně malému genomu s pouze několika geny, využívají polyomaviry pro co nejefektivnější zajištění své replikace i regulační mechanismy infikovaných buněk. Jednou z těchto regulací jsou posttranslační modifikace histonů, které tvoří nukleosomy na virové DNA. Spektrum těchto modifikací je velice široké, ale ve vztahu k polyomavirům jsou prozkoumány téměř výhradně jenom acetylace a methylace histonů. Druhou možnou regulací jsou methylace cytosinu v tzv. CpG dinukleotidech, která je spojována s potlačením genové exprese. Současné poznatky však naznačují, že tuto modifikaci polyomaviry příliš nevyužívají, ba dokonce vzhledem k neobvykle nízkému výskytu CpG dinukleotidů v jejich genomech se jí spíše vyhýbají. Cílem této práce je popsat jednotlivé typy těchto modifikací a poukázat na jejich možný význam v infekčním cyklu polyomavirů.

Klíčová slova: polyomavirus, epigenetika, modifikace histonů, methylace DNA, CpG dinukleotidy

Abstract

Similar to other viruses, polyomaviruses require for their successful replication enzymes and other proteins encoded by their host cells. Additionally, because of their relatively small genome with only a few genes, polyomaviruses utilize for their efficient replication cellular regulation mechanisms. One of these regulations are posttranslational modifications of histones, which form nucleosomes together with viral DNA. The spectrum of these modifications is very wide, but in case of polyomaviruses, almost only ones studied are histone acetylations and methylations. Second possible regulation is a methylation of cytosine in CpG dinucleotides, which is associated with repression of gene expression. Current knowledge however suggest that polyomaviruses do not utilise this kind of modification. Moreover, because of a relatively small amount of CpG dinucleotides present in their genomes, they seem to avoid it. The goal of this work is to describe the individual types of these modifications and show their possible importance in the infectious cycle of polyomaviruses.

Key words: polyomavirus, epigenetics, histone modification, DNA methylation, CpG dinucleotides

Seznam použitých zkratek

AP-1	Activator protein 1	Aktivační protein 1
AP-2	Activator protein 2	Aktivační protein 2
BKPyV	BK polyomavirus	Polyomavirus BK
Brd4	Bromodomain-containing protein 4	Protein obsahující bromodoménu 4
C/EBPβ	CAAT/enhancer binding protein β	Protein β vázající enhancer CAAT
CpG	5' Cytidine-phosphate-guanosine 3'	5' Cytidin-fosfát-guanosin 3'
c-Myc	Cellular myelocytomatosis oncogene	Buněčný onkogen myelocytomatózy
DRB	5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-benzimidizole	5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosyl-benzimidizol
DNMT	DNA methyltransferase	DNA methyltransferáza
E2F	Early-region 2 transcription factor	Transkripční faktor časně oblasti 2
JCPyV	JC polyomavirus	Polyomavirus JC
HAT	Histone acetyltransferase	Histon acetyltransferáza
HDAC	Histone deacetylase	Histon deacetyláza
HSV	Herpes simplex virus	Herpes simplex virus
LPT buňky	Large plaque transformed cells	Buňky transformované kmenem tvořícím velké plaky (u MPyV)
MCPyV	Merkel cell carcinoma polyomavirus	Polyomavirus karcinomu Merkelových Buněk
mDpy-30	mammal Dumpy-30	Savčí homolog proteinu zavalitosti 30 (identifikován u <i>C. elegans</i>)
MeCP2	Methyl-CpG-binding protein 2	Protein 2 vázající methylovaný CpG
MPyV	Mouse (murine) polyomavirus	Myší polyomavirus
NCCR	Noncoding control region	Nekódující kontrolní oblast
NF-1	Nuclear factor 1	Jaderný faktor 1
NFAT4	Nuclear factor of activated T cells 4	Jaderný faktor 4 aktivovaných T buněk
NF-κB p65	Nuclear factor κ B protein 65	Protein 65 jaderného faktoru κ B
NIH	National Institutes of Health	Národní instituty zdraví (v USA)
p300	Protein 300	Protein 300

PML	Progressive multifocal leukoencephalopathy	Progresivní multifokální leukoencefalopatie
PP2A	Protein phosphatase 2A	Protein fosfatáza 2A
pRb	Retinoblastoma protein	Retinoblastomový protein
Rad51	Protein of RADiation sensitive 51	protein objevený u mutanty 51 senzitivní k radiaci
RASSF1	Ras-associated factor 1	Faktor 1 asociovaný s proteinem Ras
RbAp48	Retinoblastoma-associated protein 48	Protein 48 asociovaný s retinoblastomovým proteinem
Set2	Set domain-containing protein 2	Protein 2 obsahující doménu Set
siRNA	small interfering RNA	malé interferující RNA
Sin3a	Swi-independent 3a	Protein 3a nezávislý na proteinech rodiny Swi
Sp1	Specificity protein 1	Protein specifity 1
SV40 virus	Simian vacuolating virus 40	Opičí vakuolující virus 40
TAU-PAGE	Triton-acetic acid-urea polyacrylamide gel electrophoresis	Polyakrylamidová gelová elektroforéza s tritonem, kyselinou octovou a močovinou
TGN	Trans-Golgi network	Trans-Golgi síť
TLR9 (21)	Toll-like receptor 9 (21)	Receptor 9 (21) podobný proteinu Toll
TNF-α	Tumor necrosis factor α	Faktor nádorové nekrózy α
TSA	Trichostatin A	Trichostatin A
VP1 (2/3)	Viral protein 1 (2/3)	Virový protein 1 (2/3)
wt	wild type	divoký typ

Obsah

1. Úvod	1
2. Organizace polyomavirového genomu.....	2
3. Histonové posttranslační modifikace polyomavirů.....	3
3.1. Základní struktura polyomavirového chromatinu	3
3.2. Modifikace histonů v průběhu infekčního cyklu viru SV40	3
3.3. Vliv inhibitorů histon deacetyláz na aktivaci promotorů polyomaviru JC	12
3.4. Profil histonových modifikací pozorovaných u polyomaviru BK.....	16
3.5. Vliv malého t antigenu na histonové modifikace myšího polyomaviru.....	17
4. Methylace DNA polyomavirů.....	18
4.1. Úvod k methylaci DNA u vyšších eukaryot	18
4.2. Suprese CpG dinukleotidů v polyomavirových genomech.....	18
4.3. Vliv <i>in vitro</i> methylace na genovou expresi polyomavirů.....	21
4.4. Methylace integrované formy myšího polyomaviru v transformovaných buňkách	26
4.5. Methylace v infekčním cyklu polyomaviru BK a ostatních polyomavirů.....	29
5. Závěr	31
Seznam použité literatury	32

1. Úvod

Čeď *Polyomaviridae* je označení virového taxonu zahrnující skupinu malých neobalených DNA virů infikujících savce a ptáky. Díky nástupu nových technologií se v dnešní době tato čeď neuvěřitelně rychle rozrůstá. Zatímco dříve jsme měli povědomí pouze o pár zástupcích této čedi, tak dnes jich již známe desítky. Mezi nejprozkoumanější polyomaviry patří myší polyomavirus (MPyV), opičí vakuolující virus 40 (SV40) a lidské polyomaviry BK (BKPyV) a JC (JCPyV). Každoročně se však objevuje několik nových polyomavirů. Mezi relativně nově objevené patří i lidský polyomavirus karcinomu Merkelových buněk (MCPyV), který je spojován se stejnojmenným kožním nádorem. Právě kvůli možnému významu polyomavirů na vznik lidských nádorových onemocnění je této čedi věnována čím dál větší pozornost.

Vlastnost, která je společná pro všechny polyomaviry, je to, že kvůli úspornosti genetické informace, jež neobsahuje žádné složky replikačního, transkripčního či sestřihového aparátu, je vysoká závislost polyomavirů na jaderných funkcích infikované buňky. Díky této závislosti na hostitelské buňce polyomaviry adoptovaly řadu kontrolních mechanismů, kterými eukaryotní buňky regulují genovou expresi. O závislosti polyomavirů na buněčných *trans* regulačních faktorech, které se vážou přímo na virovou DNA, se ví již dlouho. Dalším možným regulačním mechanismem mohou být i epigenetické změny v polyomavirovém minichromosomu, zejména pak posttranslační modifikace histonů a methylace DNA.

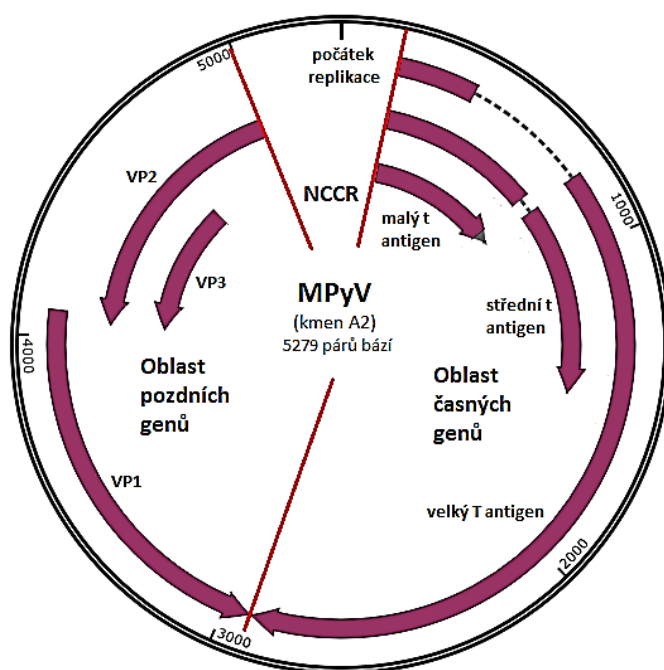
Histonové modifikace mohou hrát ohromnou roli v životním cyklu polyomavirů, protože nemusí pouze ovlivňovat elektrostatické interakce histonů a DNA, ale i vazbu dalších regulačních proteinů na modifikované aminokyselinové zbytky. Různé histonové modifikace jsou totiž spojeny s odlišně biologicky aktivním chromatinem, a tudíž jejich studium by nám mohlo pomoci i v hlubším pochopení infekčního cyklu těchto virů. Na regulaci genové exprese polyomavirů se rovněž může vysokou mírou podílet i methylace DNA. Tu může virus používat jednak při regulaci svého infekčního cyklu, ale může ji rovněž využívat i hostitelská buňka k umlčení virové exprese jako součást vrozené imunity.

Cílem této práce je popsat změny v histonových modifikacích a DNA methylaci polyomavirů a pokud možno nastínit jejich dopad na životní cyklus viru.

2. Organizace polyomavirového genomu

Ještě předtím než začnu popisovat jednotlivé typy histonových modifikací polyomavirů či jejich DNA metylaci, rád bych se zastavil u organizace jejich genomu. Je to z toho důvodu, protože se v průběhu práce budu často odkazovat na termíny jako např. oblast pozdních genů či NCCR.

Polyomavirový genom je vždy tvořen kruhovou dvouřetězcovou DNA molekulou o velikosti, která se sice mezi jednotlivými zástupci liší, ale vždy pohybuje se kolem 5 000 párů bází. Tato DNA molekula se dá funkčně rozdělit na tři nejdůležitější oblasti (obrázek č. 1). První z nich je nekódující kontrolní oblast označovaná zkratkou NCCR (z anglického NonCoding Control Region), která obsahuje virový počátek replikace a promotory pro časně a pozdní virové geny. Kromě toho zde můžeme nalézt i všechny důležité *cis* regulační oblasti, které virus využívá při svém infekčním cyklu. Druhou důležitou oblastí je úsek DNA kódující tzv. časně virové proteiny, jež se též označují jako tumorové (T) antigeny. Tento název tyto proteiny obdržely díky tomu, že jsou zodpovědné za modulaci buněčného cyklu, která u nepermisivních buněk může skončit jejich nádorovou transformací (review, Oliveira et al., 1999). Poslední oblastí je pak úsek tzv. pozdních genů, kde je kódován hlavní strukturní protein VP1 a dva minoritní kapsidové proteiny VP2 a VP3. Již podle názvu je patrné, že exprese pozdních genů se v průběhu infekce spouští až po genech časných. Kromě toho je v této oblasti u některých polyomavirů kódován i další protein, jenž nese označení Agno a jenž se podílí na modulaci buněk v pozdních fázích infekce (review k funkci, Khalili et al., 2005). V každém případě musíme mít vždy na paměti, že každý polyomavirus je svým způsobem unikátní a vždy může obsahovat o protein více či méně. Základní organizace genomu, kterou jsem zde předložil, je ale vždy zachována.



Obrázek č. 1 – Schéma organizace genomu myšího polyomaviru (kmen A2)

AC číslo v databázi GenBank J02288.1

Připraveno v programu SnapGene Viewer (<http://www.snapgene.com>)

3. Histonové posttranslační modifikace polyomavirů

3.1. Základní struktura polyomavirového chromatinu

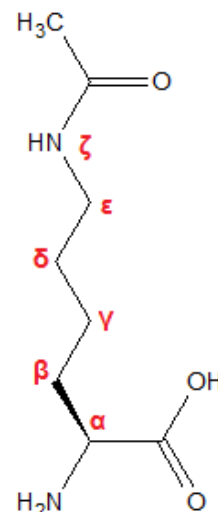
DNA eukaryot vyskytující se v jádře buňky je pro účely prostorové úspornosti organizovaná spolu s mnoha proteiny do struktury tzv. chromatinu, který má několik úrovní uspořádání. Zcela určitě základní jednotkou této organizace je struktura nazvaná nukleosom. Součástí této struktury je jednak samotná DNA a pak dále proteiny nazvané histony, a sice histony H2A, H2B, H3 a H4. Tyto histony spolu vytváří proteinový oktamer, ve kterém je každý z histonů zastoupený právě dvakrát. Okolo tohoto proteinového jádra je následně obtočeno zhruba 146 párů bází DNA (Kornberg & Thomas, 1974; Kornberg, 1974; Luger et al., 1997).

Vzhledem k tomu, že polyomaviry se replikují v jádře hostitelských buněk, není překvapující, že jejich kruhová dvouřetězcová DNA je též asociována s histony a vytváří jakýsi kruhový minichromosom (Griffith, 1975; Howe & Tan, 1977). Takováto struktura přitom není přítomná pouze v jádře infikovaných buněk, ale můžeme ji nalézt i ve virionech (Germond et al., 1975). Snímky z elektronového mikroskopu přitom ukázali u viru SV40, že jeden virový minichromosom obsahuje zhruba 20 ± 2 nukleosomů (Bellard et al., 1976). U viru SV40 byl na snímcích z elektronového mikroskopu často detekován i obnažený úsek DNA, kde se nevyskytovaly žádné nukleosomy a který odpovídal nekódující kontrolní oblasti (NCCR) viru SV40 (Jakobovits et al., 1982). Tato „mezera“ je zřejmě v NCCR udržovaná *cis* regulačními oblastmi zde přítomnými (Friez et al., 1999; Hermansen et al., 1996), na které se dále váží transkripční faktory, které tuto strukturu udržují, tak jak tomu bylo ukázáno u transkripčních faktorů AP-1 a Sp1 (B. I. Milavetz, 2002). U viru SV40 také bylo ukázáno, že kromě čtyř základních histonů je DNA polyomavirů v jádře hostitelských buněk asociována i s histonem H1 (Varshavsky et al., 1976), který se zřejmě podílí na další organizaci virového chromatinu (Muller et al., 1978). Histon H1 však nelze detekovat ve virionech, protože je v průběhu maturace částic odstraněn (La Bella & Vesco, 1980).

3.2. Modifikace histonů v průběhu infekčního cyklu viru SV40

Histony neslouží pouze ke kondenzaci genetické informace, ale hrají důležitou roli i v epigenetice. Ta je založená na tzv. posttranslačních modifikacích N-koncových oblastí histonů, které vyčnívají z jádra oktameru (Luger et al., 1997). Do dneška bylo popsáno celkem osm možných typů těchto histonových modifikací a to acetylace, methylace, fosforylace, ubiquitynalace, sumoylace, ADP-ribosylace, deiminace a prolin izomerizace (podrobnější review, Kouzarides, 2007). Ve vztahu k viru SV40, jako zástupci polyomavirů, je však nejprobádanější zejména acetylace a v dnešní době se rozšiřují poznatky i o methylaci.

Acetylace je postranslační typ modifikace histonů, kdy je aminová skupina lysinu modifikována acetátem (obrázek č. 2). Tuto modifikaci katalyzují enzymy zvané histon acetyltransferázy a naopak ji odstraňují enzymy histon deacetylázy. Tento typ modifikace histonů je ve vztahu k viru SV40 a myššímu polyomaviru znám už relativně dlouhou dobu (Coca-Prados et al., 1980; Chestier & Yaniv, 1979; La Bella & Vesco, 1980; La Bella et al., 1979; Schaffhausen & Benjamin, 1976; Vesco & Fantuzzi, 1982). V infikovaných buňkách nejsou virové minichromosomy ve srovnání s hostitelským chromatinem nijak zvýšeně acetylované. Naopak virový chromatin izolovaný z intaktních virionů je vysoce hyperacetylován. To už samo o sobě je trochu zarážející. Acetylace histonů (zejména H3 a H4) se totiž spojuje s rozvolněným chromatinem, který je transkripčně aktivní (Eberharter & Becker, 2002; Turner & O'Neill, 1995; Verdone et al., 2005). Ve virionu je ale virový chromatin v kompaktním stavu.



Obrázek č. 2 – Schéma struktury acetyllysinu

Při analýze provirionů viru SV40 bylo zjištěno, že acetylace přítomných histonů je jakýmsi mezistupněm mezi acetylací histonů ve zralém virionu a acetylací histonů v době, kdy DNA ještě není asociována s kapsidovými proteiny. To tedy znamená, že virový chromatin je acetylován i v době, kdy je DNA již téměř kompletně uzavřena v kapsidě, jak značí snímky z elektronového mikroskopu, kde nelze pozorovat žádný morfologický rozdíl mezi zralými viriony a proviriony (La Bella & Vesco, 1980). Zároveň rychlost acetylace histonů viru SV40 neprobíhá ve srovnání s těmi hostitelskými v nijak zvýšené míře. V čem se však virové histony oproti těm hostitelským liší, je téměř nulová deacetylace histonů při maturaci virionů. To tedy vedlo k závěru, že histony viru SV40 jsou zřejmě díky formování kapsidy nepřístupné pro histon deacetylázy, zatímco histon acetyltransferázám tato bariéra ze vznikající kapsidy evidentně nepřekáží v jejich funkci (Vesco & Fantuzzi, 1982).

Přítomnost hyperacetylovaných histonů rovněž vedla v 80. letech k formování hypotézy, že zvýšená acetylace virových histonů může být signálem pro formování kapsidy kolem virového minichromosomu. Pro její potvrzení byly epiteliální buňky BSC-1 infikovány virem SV40 (kmen 776) a vystaveny působení butyrátu sodného, který funguje jak inhibitor enzymů histon deacetyláz (Kruh, 1981). Autor této hypotézy očekával, že pokud jeho tvrzení platí, tak zvýšené množství hyperacetylovaných minichromosomů v infikovaných buňkách by mělo snížit množství replikující se virové DNA a zvýšit rychlost maturace virionů. Ve skutečnosti se ale stal pravý opak. Množství replikované virové DNA se zvedlo a došlo i k malé inhibici tvorby virionů (Roman, 1982). Tento výsledek tedy naznačuje, že hyperacetylace histonů viru SV40 není příčinou enkapsidace minichromosomů, ale spíše důsledkem tohoto procesu. To je v souladu s výše zmíněným pozorováním, kdy je zvýšená míra acetylace virových histonů pozorována spolu se zahájením enkapsidace virové DNA (La Bella & Vesco, 1980; Vesco & Fantuzzi, 1982).

Pokud je mi známo, tak se v dnešní době příliš nepokročilo v objasnění vztahu mezi acetylací polyomavirových histonů a tvorbou kapsidy. Naopak se zájem přesunul spíše k pozorování histonových modifikací, ke kterým dochází v průběhu produktivní infekce. Tomuto tématu se téměř exkluzivně věnuje skupina autorů z Univerzity v Severní Dakotě a jako model využívají virus SV40 (kmen 776).

V tomto směru první publikovanou prací byl článek Barryho Milavetze, který vyšel v roce 2004 a který se soustředil na acetylaci polyomavirových histonů v raných fázích infekce virem SV40. Tento článek popisoval, co se stává s hyperacetylovanými minichromosomy viru SV40 již po 30 minutách od infekce buněk BSC-1, tj. v době, kdy se infikující viriony ještě nacházejí v cytoplasmě. Pomocí imunoprecipitace nefixovaných minichromosomů SV40 bylo zjištěno, že je zde významný rozdíl mezi množstvím hyperacetylovaných histonů H3 a H4. Protilátky proti tetra a triacetylovanému histonu H4 imunoprecipitovaly zhruba $11 \pm 4 \%$ veškerého virového chromatinu. Naopak protilátky proti diacetylovanému histonu H3 imunoprecipitovaly jen $5 \pm 1 \%$ veškerého chromatinu. Na základě mnoha dalších pokusů, které zde nebudu rozebírat, nakonec autor článku dospěl k závěru, že v čase 30 minut po infekci můžeme v buňkách BSC-1 detekovat dvě izoformy minichromosomů viru SV40. První izoforma obsahuje jak hyperacetylovaný histon H3 tak hyperacetylovaný histon H4, zatímco druhá izoforma obsahuje jen hyperacetylovaný histon H4 (B. Milavetz, 2004).

Vzhledem k tomu, že tyto izoformy minichromosomů byly pozorovány již 30 minut po infekci, je zřejmé, že se tyto izoformy nacházely už ve virionech, které infikovaly buňky. To by ale znamenalo, že se odlišné izoformy minichromosomu SV40 musely vyskytovat i v infikovaných buňkách, ve kterých se tyto viriony sestavily. Odlišné izoformy by tedy dle autora mohly odrážet i jejich funkci předtím než byly enkapsidovány (B. Milavetz, 2004). Například bylo ukázáno, že zvýšená acetylace histonu H4 je primárně spojována s replikací jaderné DNA (Jasencakova et al., 2000). Naopak jak zde již bylo zmíněno, tak hyperacetylace histonů H3 a H4 je spojována s aktivní transkripcí (Eberharter & Becker, 2002; Turner & O'Neill, 1995; Verdone et al., 2005).

Ve své další publikaci se autoři z Univerzity v Severní Dakotě soustředili na to, jak se mění acetylace histonů H3 a H4 v různých oblastech minichromosomu viru SV40 v průběhu infekčního cyklu. Ukázali, že 30 minut po infekci může být hyperacetylovaný histon H4 přítomný na virové DNA téměř kdekoli se stejnou pravděpodobností. Naopak hyperacetylovaný histon H3 byl ve stejném časovém úseku preferenčně asociován s nekódující kontrolní oblastí (NCCR) viru SV40 (Balakrishnan & Milavetz, 2005). Dvě odlišné izoformy hyperacetylovaného virového chromatinu, které byly popsány v předešlém odstavci, zřejmě mají na základě těchto výsledků podobně organizovaný chromatin, co se týče histonu H4. Evidentně se liší pouze v přítomnosti hyperacetylovaného histonu H3 v NCCR viru SV40 (Balakrishnan & Milavetz, 2005).

V čase 8 hodin po infekci BSC-1 buněk virem SV40 byl pozorován zase trochu jiný vzor acetylce. V tomto časovém bodě bylo ukázáno, že téměř celý genom viru SV40 je pokryt jak hyperacetylovaným histonem H3 tak hyperacetylovaným histonem H4, což zřejmě značí aktivně transkribovaný chromatin (Eberharter & Becker, 2002; Turner & O'Neill, 1995; Verdone et al., 2005). To je opět trochu zarážející fakt. V tomto časovém bodě totiž dochází jenom k transkripci časných genů (Tooze, J., 1980) a tudíž bychom očekávali, že i jenom oblast časných genů a jejich promotoru by byla takto hyperacetylována. Autoři to okomentovali tak, že už dříve bylo ukázáno, že při časné transkripci se občas RNA polymeráza II proče až do oblasti pozdních genů (Tooze, J., 1980) a že by právě tento jev mohl být příčinou pozorované acetylce (Balakrishnan & Milavetz, 2005).

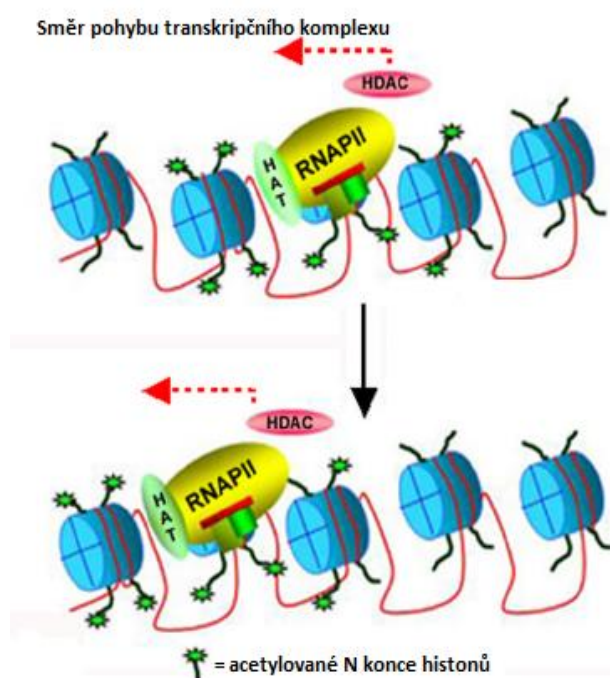
Posledním časovým bodem, který autoři studovali, bylo 48 hodin po infekci. Zde autoři zjistili, že hyperacetylované histony H3 a H4 jsou opět asociované s téměř celou DNA viru SV40. U hyperacetylovaného histonu H4 se ale ukázalo, že je preferenčně asociován s oblastí pozdních genů (Balakrishnan & Milavetz, 2005). V tomto časovém úseku plní virová DNA několik rolí. Jednak dochází k replikaci a dále pak k pozdní a limitované časné transkripci (Tooze, J., 1980). Výsledky mapování hyperacetylovaných histonů jsou tedy podle autorů pro čas 48 hodin po infekci jakýmsi průměrem všech přítomných možných acetylačních izoform minichromosomů viru SV40 (Balakrishnan & Milavetz, 2007).

Autoři dále vyjádřili svůj zájem o studium acetylce aktivně transkribovaných oblastí viru SV40. K tomu, aby si ale byli jistí, že skutečně studují oblasti, které jsou v danou chvíli transkribované, potřebovali určitý marker, jenž je vždy asociován s aktivní transkripcí. V tomto ohledu nemůže existovat lepší marker než přítomnost samotné RNA polymerázy II.

Při dvojitých imunoprecipitacích, kdy nejdříve došlo k selekci aktivně transkribovaných úseků pomocí protilátky proti RNA polymeráze II, byly minichromosomy následně fragmentovány sonifikací a znovu imunoprecipitovány protilátkami tentokrát proti hyperacetylovanému histonu H3 či H4. Ukázalo, že RNA polymeráza II je téměř vždy asociována s hyperacetylovanými histony H3 a H4. Naopak hyperacetylované histony H3 a H4 se vyskytují v genomu viru SV40 i nezávisle na přítomnosti RNA polymerázy II (Balakrishnan & Milavetz, 2006). Vzhledem k imunoprecipitacím, které ukazují, že množství hyperacetylovaných histonů H3 a H4 asociovaných s RNA polymerázou II je rovnoměrné, můžeme předpokládat, že každý nukleosom v blízkosti RNA polymerázy II má oba tyto typy histonů vždy acetylovány. Naopak v oblastech, kde se právě RNA polymeráza II nevyskytovala, bylo množství hyperacetylovaných histonů H3 a H4 odlišné, a tudíž i samotná struktura nukleosomu musela být jiná ve vztahu k acetylacím histonů H3 a H4. Samozřejmě při této analýze bylo možno v minichromosomu viru SV40 detekovat i histony H3 a H4, které nebyly vůbec acetylovány. Takovéto histony ale nikdy nebyly nalezeny v blízkosti RNA polymerázy II. Důležitou poznámkou, kterou je také nutno zmínit je, že tyto výsledky vypovídají pouze o protein kódujících

oblastech viru SV40, a ne o nekódující kontrolní oblasti, jejíž studium bylo v tomto ohledu mnohem obtížnější a jejíž výsledky prozatím autoři nepublikovali (Balakrishnan & Milavetz, 2007).

Uvedené výsledky vedly autory k formulaci modelu, který popisuje acetylaci histonů viru SV40 v průběhu transkripce. Během aktivní transkripce se RNA polymeráza II pohybuje podél virového chromatinu a je s ní zřejmě asociována histon acetyltransferáza (dnes se předpokládá že p300, viz dále), která acetyluje histony H3 a H4 v blízkých nukleosomech. Jakmile pak RNA polymeráza II opustí oblast, která byla předtím acetylována, tak mají volné pole enzymy histon deacetylázy, které oblast začnou deacetylovat (obrázek č. 3, Balakrishnan & Milavetz, 2007).



Obrázek č. 3 – Schéma procesu acetylace histonů v průběhu aktivní transkripce viru SV40.

V infikovaných buňkách je virová DNA asociována s histony hostitelské buňky. Když se pak během transkripce RNA polymeráza II (RNAPII) pohybuje po DNA templátu, dochází k hyperacetylaci histonů v bezprostřední blízkosti polymerázy pomocí histon acetyltransferázy (HAT), která je asociována s transkripčním komplexem.

Následná dekonkondenzace virového chromatinu pak usnadňuje průchod polymerázy. Jakmile RNA polymeráza II opustí hyperacetylovanou oblast dochází k částečné deacetylaci díky enzymům histon deacetylázám (HDAC). To zda HDAC je či není přímo asociovaná s transkripčním komplexem, doposud není jisté.

Převzato a upraveno z publikace (Balakrishnan & Milavetz, 2007)

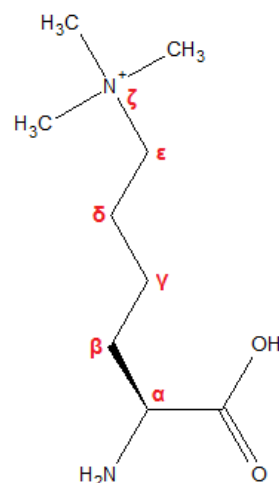
Pokud za rozdíl v odlišné míře acetylace virových histonů, která byla pozorována u oblastí, kde RNA polymeráza II je nebo není přítomná, skutečně může aktivita histon deacetyláz, tak po jejich inhibici butyrátem sodným (Kruh, 1981) by mělo dojít k tomu, že se míra acetylace sjednotí. A právě i tento výsledek byl pozorován. Po inhibici deacetyláz se i úseky bez RNA polymerázy II mírou své hyperacetylace podobaly úsekům, kde polymeráza přítomná byla (Balakrishnan & Milavetz, 2007). Doposud však není známo jaká histon deacetyláza (či kombinace více deacetyláz) se účastní deacetylace virových histonů.

Ve snaze ověřit výše zmíněný model se autoři rozhodli sledovat i kolokalizaci RNA polymerázy II a vybrané histon acetyltransferázy. Pro svoje studium si přitom vybrali protein p300, což je acetyltransferáza, u které již dříve bylo ukázáno, že tvoří komplex s RNA polymerázou II (Neish et al., 1998). I zde se tento fakt potvrdil, neboť když byla provedena dvojstupňová chromatinová imunoprecipitace nejdříve proti RNA polymeráze II a poté proti proteinu p300, byla ukázána interakce těchto dvou proteinů ve virovém chromatinu. Kdykoliv byla v protein kódujících

oblastech nalezena histon acetyltransferáza p300, byla spolu s tímto proteinem v komplexu i RNA polymeráza II. Tento stav však naopak úplně neplatí, protože RNA polymerázu II lze ve virovém chromatinu nalézt i bez proteinu p300. Jedinou výjimkou, kdy nebyl p300 nalezen spolu s polymerázou, byla nekódující kontrolní oblast (NCCR) viru SV40. To však není v rozporu s dosavadními daty, protože p300 interaguje s různými transkripčními faktory jako například Sp1, které se do NCCR viru SV40 vážou (Dyran & Tjian, 1983; Suzuki et al., 2000). Snížení koncentrace proteinu p300 pomocí siRNA též mělo vliv na transkripci pozdních genů, která byla sledována v čase 48 hodin po infekci. V těchto podmínkách totiž došlo k potlačení exprese pozdních genů a ke snížení acetylace histonů H3 a H4 v okolí RNA polymerázy II. To naznačuje, že p300 skutečně může být histon acetyltransferáza zodpovědná, za hyperacetylaci histonů v průběhu transkripce. I po snížení exprese p300 však bylo možné detekovat RNA polymerázu II v protein kódujících oblastech viru SV40. To znamená, že p300 není protein nezbytný pro iniciaci transkripce, ale že se spíše jedná o protein, který je nutný pro její hladký průběh (Balakrishnan & Milavetz, 2008). Důležité je si také uvědomit, že všechny zde zmíněné informace patrně neplatí jenom pro virus SV40 či pro polyomaviry jako takové, ale patrně fungují v molekulární biologii jejich hostitelských buněk.

V posledních několika letech se pak přesunula pozornost autorů z Univerzity ze Severní Dakoty od studia acetylace histonů ke studiu jejich methylace. Tato posttranslační modifikace histonů je založena na připojení methylové skupiny (CH_3) na aminoskupinu lysinu (obrázek č. 4). Tento typ modifikace je ale na rozdíl od acetylace vícestupňový, a proto v histonech můžeme najít jak mono- tak di- či trimethyllysin. Kromě toho může být u histonů methylací modifikována i aminokyselina arginin (review k modifikaci, Di Lorenzo & Bedford, 2011). Její modifikace však v souvislosti s SV40 nebyla doposud studována, a proto se jí ani dále nebudu věnovat. Podobně jako acetylace je i methylace histonů katalyzována enzymy histon methyltransferázami. Odstranění methylace je pak katalyzováno histon demethylázami. Zatímco acetylace histonů je obecně spojována s transkripční aktivací (Eberharter & Becker, 2002; Turner & O'Neill, 1995; Verdone et al., 2005), funkce různých methylací histonů je mnohem komplexnější a každá forma methylace lysinu může být asociována s trochu jiným regulačním procesem (review, Black et al., 2012). Jednotlivé formy histonových modifikací se můžou též ovlivňovat. U kvasinek bylo například ukázáno, že methylace lysinu 36 na histonu H3 enzymem Set2 způsobuje následnou deacetylaci histonů (Carrozza et al., 2005; Keogh et al., 2005).

První methylace histonů, která byla u viru SV40 studována, byla methylace lysinu 20 v histonu H4 (H4K20). Ukázalo, že v minichromosomu viru SV40 lze tento lysin detekovat jak monomethylovaný (H4K20me1) tak trimethylovaný (H4K20me3). Zatímco H4K20me1 bylo možné



Obrázek č. 4 – Struktura trimethyllysinu

detekovat ve virovém chromatinu v průběhu celého infekčního cyklu a to včetně na kondensovaném minichromosomu ve virionu, H4K20me3 bylo možné detekovat pouze v raných stádiích infekce. Společná vlastnost obou těchto modifikací pak byla jejich přítomnost podél celého genomu viru SV40 (Balakrishnan et al., 2010).

Nejvyšší frekvence výskytu H4K20me1 ve virovém chromatinu autoři pozorovali 30 minut po infekci v infikujících virionech. V následujících hodinách pak frekvence této modifikace klesala spolu s postupem lytického cyklu. V nově vzniklých virionech se H4K20me1 opět vyskytoval ve zvýšené míře. To naznačuje, že úloha této modifikace by mohla být v enkapsidaci virových minichromosomů (Balakrishnan et al., 2010). Kromě toho bylo pozorováno, že lysin 20 histonu H4 je monometylován již během replikace nových virových minichromosomů. I přestože H4K20me1 byl často pozorován v aktivně transkribovaných oblastech (Talaszi et al., 2005), autoři nepozorovali významnou koimunoprecipitaci takto modifikovaných histonů spolu s RNA polymerázou II (Balakrishnan et al., 2010).

Jak bylo již zmíněno, tak autoři pozorovali H4K20me3 pouze v raných stádiích infekce a to už v čase 30 minut po infekci (Balakrishnan et al., 2010). To je však poněkud zarážející, protože podle jiných pozorování by se v této době měly viriony SV40 nacházet včetně enkapsidovaných kruhových minichromosomů v endosomech infikovaných buněk (Engel et al., 2011). Proto je na místě otázka, kde virové minichromosomy mohly získat tuto modifikaci? Možná tu však vysvětlení být může. Překvapivě protein mDpy-30, podjednotka H3K4 methyltransferázového komplexu, byl nalezen ve strukturách TGN (Trans-Golgi network) a některé pokusy naznačovaly jeho roli v regulaci endosomálního buněčného transportu (Z. Xu et al., 2009). Pro H3K9 methyltransferázový komplex však podobná lokalizace a funkce v endocytické dráze doposud studována nebyla. Pokud by se však tento komplex či nějaká jeho varianta skutečně nacházela v endosomálním systému, je stále otázkou jak by mohl tento komplex metylovat virové histony uzavřené ve virionu. Zde by mohlo hrát roli další pozorování autorů z Univerzity v Severní Dakotě, kteří si všimli, že v čase mezi 30 minutami a 4 hodinami po infekci dochází k úbytku virové DNA přítomné v infikovaných buňkách a že mezi degradovaným chromatinem jsou nukleosomy obsahující modifikaci H3K9me3 (Balakrishnan et al., 2010). Při degradaci virionů by se tedy mohla naskytnout určitá možnost pro potenciální histon methyltransferázu k methylovi virových histonů. Autoři článku však přišli s trochu odlišnou hypotézou, které byla založena na tom, že H3K9me3 není důsledkem degradace virionů SV40, ale naopak její příčinou, a že tato methylovi histonů je jakýmsi obranným mechanismem buňky před cizorodou DNA (Balakrishnan et al., 2010). Zde je však opět nasnadě otázka jak by se methyltransferáza mohla dostat přes kapsidové proteiny k virové DNA. Všechna tato tvrzení jsou však pouhé spekulace, a to buď mé anebo autorů publikace, a jejich správnost je velkým otazníkem. Nicméně dle mého názoru se jedná o zajímavou oblast, které by měla být dále studována.

Při studiu methylovanosti histonu H3 stály v centru zájmu především lysiny v pozici 4 a 9 (H3K4 a H3K9). Při imunoprecipitacích se ukázalo, že v případě H3K4 byly všechny tři stupně methylovanosti lysinu významně přítomné pouze v čase 48 hodin po infekci. Naopak u H3K9 byly všechny tři stupně methylovanosti pozorovány v průběhu celého infekčního cyklu. Jedinou výjimkou byl nízký výskyt dimethylovaného H3K9 24 hodin po infekci (B. Milavetz et al., 2012).

Autory také velmi zajímal vztah mezi těmito modifikacemi a represí časné transkripce, která reguluje množství produktů časných genů v pozdních fázích infekce (Tooze, J., 1980). K objasnění tohoto vztahu si autoři vybrali dvojici mutant viru SV40. První z nich byla mutanta cs1085, která byla defektní ve vazbě velkého T antigenu do nekódující kontrolní oblasti viru SV40. Díky tomu tato mutanta nebyla schopná reprimovat časnou transkripci v pozdějších stadiích infekce (DiMaio & Nathans, 1982). Druhá mutanta nesla označení SM (SV40 mikroRNA) a ta, díky mutaci v mikroRNA, produkovala nadbytek velkého T antigenu (Sullivan et al., 2005), díky čemuž se očekávala i vyšší represe časné transkripce než u divokého viru SV40. Pomocí zmíněných dvou typů mutantů autoři nakonec zjistili, že represe časného transkripce způsobená vazbou velkého T antigenu do nekódující kontrolní oblasti (NCCR) viru SV40 je v čase 48 hodin po infekci spojena hlavně se zvýšeným výskytem modifikace H3K9me1 (B. Milavetz et al., 2012), která je asociovaná s transkripční represí i v jiných případech (přehledný článek k modifikacím, Kouzarides, 2007). S vyšší represí byl též spojen i vyšší výskyt zbylých methylovaných forem H3K9 (B. Milavetz et al., 2012).

Při represí časných genů v pozdních fázích infekčního cyklu se také ukázalo, že modifikace H3K9me1 je vysoce závislá na aktivní replikaci virové DNA. Pokud totiž mezi 24. a 48. hodinou po infekci zablokujeme veškerou replikaci DNA pomocí inhibitoru aphidicolinu (Ohashi et al., 1978), silně poklesne i výskyt modifikace H3K9me1 (Kallestad et al., 2013). Na základě tohoto pozorování a dalších důkazů, které poukazují na pokles H3K9me1 v časných fázích infekce, autoři dospěli k závěru, že modifikace H3K9me1 nemůže být zodpovědná za represí časných genů, jež předchází replikaci DNA viru SV40 (Kallestad et al., 2013). Při dalším studiu mutant viru SV40 se naopak ukázalo, že se začínající represí časných genů, která může být pozorována už v čase 8 hodin od infekce (Tooze, J., 1980), je naopak spojena nízká hladina výskytu modifikace H3K9me2 (Kallestad et al., 2013).

Podrobněji byla prozkoumána i dimethylace a trimethylace lysinu 9 histonu H3 (H3K9me2/3). Zvláštní na těchto modifikacích je totiž to, že na rozdíl od již zmiňované modifikace H3K9me1, nejsou závislé na aktivní replikaci virové DNA (Kallestad et al., 2013). Co však mají modifikace H3K9me2 a H3K9me3 společné s H3K9me1 je jejich zvýšený výskyt ve virovém minichromozomu při represí časné transkripce v pozdních fázích infekce (Kallestad et al., 2014). Zatímco H3K9me1 je spojován s represí transkripce časných genů po vazbě velkého T antigenu do NCCR viru SV40, tak na základě pokusů s transkripčním inhibitorem DRB, se ukázalo, že H3K9me2 a H3K9me3 jsou spíše spojeny s obecnou transkripční represí nezávislou na velkém T antigenu (Kallestad et al., 2014). Další pokusy s SV40 mutovaným v NCCR (mutanta cs1085) navíc naznačují, že modifikace H3K9me2/3 nevyžadují

pro svůj vznik jako substrát H3K9me1. Aby si autoři byli jistí, že zvýšené množství H3K9me2/3 není důsledkem nespecifické aktivity DRB, tak buňky BSC-1 vystavili i působení butyrátu sodného (Kruh, 1981), který je inhibitorem histon deacetyláz, čímž stimuluje transkripci genů. Podle očekávání se u virových minichromosomů výrazně snížila frekvence výskytu jak H3K9me2 tak H3K9me3, což značí, že aktivní transkripce či hyperacetylace histonů brání výskytu těchto modifikací v polyomavirových minichromosomech (Kallestad et al., 2014).

Jedna věc, která zde určitě stojí za zmínění, je i pozorování autorů, že v infikovaných buňkách můžeme v čase 48 hodin po infekci pozorovat několik odlišných virových „epigenomů“. Na základě jejich pozorování a komplexních pokusů s imunoprecipitací chromatinu stanovili autoři jejich počet na celkem pět izoform (B. Milavetz et al., 2012), jejichž typické histonové modifikace můžeme vidět v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1 – Složení odlišných epigenomů viru SV40 po 48 hodinách od infekce

Číslo izoformy	Pozorované modifikace
1	Primárně H3K4me2 spolu s H3K9me1/2/3 a hyperacetylaným histonem H4
2	Primárně H3K4me2 spolu s hyperacetylovanými histony H3 a H4
3	Téměř výhradně H3K4me3 s trochou hyperacetylovaného histonu H4
4	Kombinace H3K9me, H3K9me2, H4K20me a hyperacetylovaného histonu H4
5	Primárně H3K9me3 se stopami všech ostatních zde zmíněných modifikací

Informace převzaty z publikace B. Milavetz et al., 2012

Odlišné epigenomy viru SV40 však nebyly pozorovány pouze 48 hodin po infekci, ale také ve virionech. Zde autoři tvrdí, že u divokého viru identifikovali minimálně tři izoformy (nezveřejněné výsledky, zmíněno v review B. Milavetz & Balakrishnan, 2015), jejichž modifikace můžeme nalézt v tabulce č. 2. Pokud se na tyto epigenomy blíže podíváme, tak si můžeme všimnout, že se tyto výsledky shodují i s předešlým pozorováním, kdy v čase 30 minut po infekci byly identifikovány dvě izoformy minichromosomů s odlišným typem acetylce histonů (B. Milavetz, 2004).

Tabulka č. 2 – Složení odlišných epigenomů viru SV40 ve virionech

Číslo izoformy	Pozorované modifikace
1	Primárně H3K9me3 s trochou H4K20me1, H3K9me2 a hyperacetylovaným histonem H4
2	H3K9me1 spolu s H3K9me2, H4K20me1 a hyperacetylovaným histonem H4
3	Hyperacetylované histony H3 a H4 spolu s H4K20me1

Informace převzaty z publikace B. Milavetz & Balakrishnan, 2015

Chtěl bych zde však velmi zdůraznit, že počet uvedených epigenomů (jak v tabulce č. 1, tak v tabulce č. 2) a jejich histonových modifikací je založen pouze na studiu modifikací, kterými se autoři článku aktivně zabývali. Jelikož ve skutečnosti existuje mnohem více typů histonových modifikací než jen methylylace a acetylce lysinů, může být skutečný počet různých epigenomů mnohem vyšší a může se lišit v různých fázích infekce.

3.3. Vliv inhibitorů histon deacetyláz na aktivaci promotorů polyomaviru JC

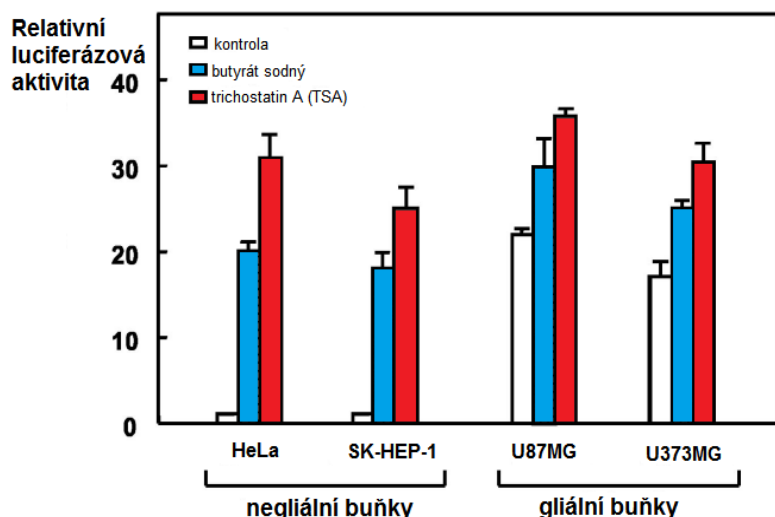
Dalším polyomavirem, u něhož byla studována epigenetická regulace zejména ve vztahu k aktivaci virových promotorů, byl lidský polyomavirus JC (JCPyV), který je původcem závažného lidského onemocnění, jemuž se říká progresivní multifokální leukoencefalopatii (zkratka PML). Tato velmi těžká choroba postihuje centrální nervovou soustavou člověka a projevuje se demyelinizací axonů. Hlavní příčinou demyelinizace je destrukce oligodendrocytů vlivem aktivní replikace JCPyV. I přes vysokou míru prevalence JCPyV v populaci (na základě detekce IgG zhruba 58 %, Egli et al., 2009) byla však donedávna PML relativně vzácnou chorobou. V dnešní době se však incidence jejího výskytu značně zvýšila a to především u pacientů trpících nemocí AIDS či jiných jedinců s postiženou funkcí imunitního systému (review k nemoci, Adang & Berger, 2015).

Vůbec první publikace, která se zabývala epigenetikou JCPyV, vyšla v roce 2003. Výsledky této publikace se přitom zaměřily především na vztah mezi gliální specifitou JCPyV a posttranslačními modifikacemi jeho virových histonů. Autoři tohoto článku však původně neměli v plánu věnovat se histonovým modifikacím JCPyV, ale naopak chtěli studovat vliv inhibitorů enzymů histon deacetyláz na aktivaci jeho časného promotoru u permisivních a nepermisivních buněčných linií. K tomuto účelu autoři nepotřebovali kompletní genom JCPyV ale pouze jeho NCCR (z kmene MH1), kterou klonovali do reportérového plazmidu s genem pro luciferázu tak, aby byl reportérový gen pod kontrolou časného promotoru. Takto připravený plazmid poté autoři transfekovali do 2 lidských permisivních gliálních linií (U87MG a U373MG) a do 2 nepermisivních negliálních linií (SK-HEP1 a HeLa linie). Transfekované buňky poté byly kultivovány v přítomnosti jednoho ze dvou vybraných inhibitorů histon deacetyláz, jimiž byly trichostatin A (TSA) či butyrát sodný (Kruh, 1981; Yoshida et al., 1990).

Na základě enzymové aktivity luciferázy bylo stanoveno, že u gliálních linií byla v přítomnosti histon deacetylázových inhibitorů zvýšena exprese luciferázy o méně než dvojnásobek oproti kontrole. Naopak u negliálních linií byla tato exprese luciferázy zvýšena dvacetkrát až třicetkrát oproti kontrole! Ve výsledku se pak relativní luciferázová aktivita v přítomnosti inhibitorů blížila podobným hodnotám u všech buněčných linií (obrázek č. 5), i když je pravdou, že u gliálních buněk byla tato aktivita stále o něco vyšší. Tuto indukci v expresi luciferázy přitom stimulovaly oba typy inhibitorů, přičemž TSA se ukázal být potentnějším inhibitorem (Kim et al., 2003).

Na základě těchto výsledků autoři formulovali hypotézu, že acetylace a deacetylace histonů jsou zřejmě jedny z klíčových regulačních faktorů ovlivňujících latenci JCPyV v lidských buňkách (Kim et al., 2003). Tuto hypotézu autoři dále podpořili pokusy s protilátkami proti acetylovanému histonu H3 (proti jaké acetylové skupině autoři nezveřejnili). Ukázalo se, že histony H3 přítomné v promotorové oblasti NCCR JCPyV jsou skutečně acetylované v případě, že byly izolovány z linie U87MG. Dále pokud byly buňky této linie opůsobené TSA, tak se podle očekávání zvýšila i míra acetylace histonů H3. Naopak u HeLa buněk nebyla podobná acetylace H3 histonů detekována, pokud

buňky nebyly vystaveny TSA. Pokud ale byly vystaveny TSA, tak se míra acetylace H3 histonů asociovaných s časným promotorem JCPyV opět téměř vyrovnala gliální linii U87MG. Tyto výsledky tedy naznačují, že jsou histony H3 asociované s promotorovou oblastí JCPyV udržovány v acetylovaném (tedy rozvolněném stavu) stavu v gliálních buňkách ale nikoliv v buňkách negliálních (Kim et al., 2003).



Obrázek č. 5 – Graf demonstrující inducibilitu časného promotoru JCPyV (kmen MH1) v přítomnosti TSA a butyrátu sodného, které působí jako inhibitory enzymů histon deacetyláz.
Do grafu jsou zahrnuty i rozdíly mezi gliálními a negliálními liniemi.

Upraveno a převzato z publikace Kim et al., 2003.

Dalším krokem v této analýze pak bylo samotné určení důležitých regulačních oblastí, které jsou zodpovědné za zvýšenou expresi z časného promotoru JCPyV. K tomuto účelu autoři připravili celou řadu mutant, u kterých analyzovali míru exprese luciferázy v negliálních buňkách po přidání inhibitorů. Ukázalo se, že pro zvýšení exprese vlivem histon deacetylázových inhibitorů je zapotřebí Sp1 vazebné místo (obrázek č. 6) lokalizované proti směru časné transkripce od TATA boxu. Při mutaci této oblasti totiž v přítomnosti inhibitorů poklesla míra syntézy luciferázy zhruba šestkrát oproti nemutované kontrole (Kim et al., 2003). Dále pak byly jako důležité oblasti identifikovány duplikované enhancerové oblasti přítomné v NCCR (obrázek č. 6). K poklesu inducibility časného promotoru pomocí inhibitorů stačila delece i jen jednoho z těchto dvou enhancerů. Pokud ale byly deletovány oba, tak se aktivace časného promotoru skoro úplně potlačila (Kim et al., 2003). Již dříve bylo ukázáno, že se do těchto enhancerů vážou transkripční faktory, jakými jsou např. NF-1 a AP-1 (Amemiya et al., 1992). Autoři tedy dále mutovali i vazebná místa pro tyto dva faktory a pozorovali míru syntézy luciferázy. Mutace těchto vazebných míst ale neindukovala pokles v aktivitě časného promotoru pomocí histon deacetylázových inhibitorů, tak jak tomu bylo pozorováno při kompletní deleci celého enhanceru (Kim et al., 2003).

Oblast enhanceru a časného promotoru JCPyV



Obrázek č. 6 – Schéma časné oblasti studovaného JCPyV (kmen MH1). U červeně vyznačených úseků byla ukázána role v indukci exprese z časného promotoru po přidání TSA či butyrátu sodného.

Převzato a upraveno z publikace Kim et al., 2003.

Důležité je také podotknout, že indukce exprese časného promotoru nebyla testována pouze na MH1 kmenu JCPyV ale také na kmenu Mad-1 a na časném promotoru viru SV40. Časný promotor kmene Mad-1 odpovídal na stimulaci transkripce pomocí inhibitorů podobným způsobem jako promotor MH1 kmenu, až na to, že tato stimulace nedosahovala takové výše. Časný promotor viru SV40 byl též stimulován inhibitory histon deacetyláz, ale v mnohem menší míře a hlavně zde nebyl téměř žádný rozdíl v expresi mezi gliálními a negliálními buňkami (Kim et al., 2003). To tedy naznačuje, že inducibilita časného promotoru v negliálních buňkách po přidání TSA či butyrátu, je specifická pro JCPyV a nikoli pro polyomaviry jako takové.

Jinými slovy to vypadá, že histony asociované s časným promotorem JCPyV jsou v gliálních buňkách prostřednictvím specifických transkripčních faktorů udržovány v acetylovaném stavu, díky čemuž se DNA stává dostupnější pro další transkripční faktory či RNA polymerázu. Naopak u negliálních buněk jsou ty samé histony bez detekovatelné acetylace a zřejmě díky tomu je minichromosom JCPyV více kompaktní a tedy i nedostupný pro transkripční faktory v testovaných negliálních buňkách (Kim et al., 2003).

Dosti podobné výsledky byly publikovány i v roce 2013, nikoli však na kmenu MH1, ale na dříve charakterizovaném kmenu Mad-1. I zde byla studována pouze nekódující kontrolní oblast (NCCR) genomu JCPyV, která byla opět klonována do reportérového plazmidu s genem pro luciferázu. V tomto případě ale byla sledována exprese pouze v gliálních buňkách, a to v oligodendrogliomové linii TC620, a též byl kromě časného promotoru porovnáván i promotor pozdní. Jako inhibitory byly opět použity TSA a butyrát sodný. I zde byla opět ukázána zvýšená aktivace virových promotorů po zablokování histon deacetyláz. Bylo ukázáno, že dochází k aktivaci jak časného tak i pozdního promotoru JCPyV, přičemž časný promotor byl o něco více aktivován (Wollebo et al., 2013). Zajímavé však bylo, že vyšší aktivace promotorů byla pozorována při použití butyrátu sodného, zatímco v předešlé publikaci naopak transkripci více stimuloval TSA. Tímto pozorováním se však autoři nezabývali a bližší vysvětlení rozvedeno nebylo.

I zde se autoři snažili identifikovat *cis* elementy přítomné na virové DNA, které by se mohly účastnit aktivace obou virových promotorů po zablokování histon deacetyláz. U Mad-1 kmene se totiž například nevyskytuje vazebné místo pro Sp1 přítomné upstream od TATA boxu, jehož funkce v indukci exprese z časného promotoru po opůsobení inhibitorů histon deacetyláz byla ukázána v předešlé publikaci (Kim et al., 2003). To je obecně problém při studiu JCPyV, jelikož u každého pacienta, který trpí PML je za tuto nemoc zodpovědný JCPyV s trochu jinou sekvencí NCCR. Tato oblast je totiž u JCPyV vysoce variabilní (Grinnell et al., 1983; Martin et al., 1985). K představám v tomto úseku přitom dochází u každého pacienta individuálně z tzv. archetypálního JCPyV, který je přenosnou formou JCPyV a který lze detekovat i v moči asymptomatických pacientů (Yogo et al., 1990). U různých izolátů JCPyV tedy můžou některé regulační elementy chybět a jinde mohou ty samé elementy být duplikovány. To ve výsledku může ovlivnit i regulaci jejich životního

cyklu. Jak bylo ukázáno jinde, tak varianty JCPyV s přestavěným NCCR se od archetypálního viru liší vyšší expresí časných genů a mírou replikace (Gosert et al., 2010).

Když se však vrátíme ke studiu *cis* regulačních oblastí kmene Mad-1, jež by mohly hrát roli v aktivaci virových promotorů při inhibici histon deacetyláz, je nutno zmínit, že autoři v tomto případě nehledali úplně naslepo, ale rovnou se soustředili na tzv. KB element, jež na DNA leží mezi počátkem virové replikace a časným promotorem a jemuž se autoři dříve věnovali. Tento element je totiž důležitou regulační oblastí genomu JCPyV, do kterého se vážou proteiny jako například NF- κ B, NFAT4 a C/EBP β (Romagnoli et al., 2009; Wollebo et al., 2012) a jež je stimulován například i cytokinem TNF- α (Wollebo et al., 2011). Kromě toho bylo ukázáno, že se do této oblasti váže a reguluje transkripci i protein Rad51 (White et al., 2014), který je součástí opravných mechanismů buňky (review; Baumann & West, 1998). Při mutování KB elementu v úsecích vázajících NF- κ B a NFAT4 se také skutečně potvrdila role tohoto elementu v aktivaci časného promotoru po zablokování histon deacetyláz, protože u mutant nedocházelo ke zvýšené expresi luciferázy po přidání TSA (Wollebo et al., 2013). Důležitou roli v této regulaci musí hrát i přímo protein NF- κ B p65. Při studiu pozdního promotoru JCPyV se totiž ukázalo, že při zvýšení koncentrace tohoto proteinu pomocí expresního plazmidu došlo v kombinaci s TSA ke kooperativnímu zvýšení exprese luciferázy, která byla až 4-krát vyšší oproti kontrole, kdy nedošlo k nadexpresi NF- κ B p65 (Wollebo et al., 2015). Naopak podle očekávání snížení exprese NF- κ B p65 pomocí siRNA vedlo k potlačení aktivace virových promotorů i v případě, že byly buňky vystavené TSA (Wollebo et al., 2013). Kromě toho autoři testovali i vliv proteinu p300, což je známá acetyltransferáza, která mimo jiné asociuje i s NF- κ B p65 (Gerritsen et al., 1997). Ukázali, že zvýšená hladina tohoto proteinu též zvyšuje aktivitu virových promotorů a to i v nepřítomnosti TSA či butyrátu a v kooperaci s NF- κ B p65 (Wollebo et al., 2013).

Dále i zde byla ověřena acetylace samotných histonů asociovaných s NCCR. Ukázalo se, že specifickou protilátkou lze detekovat acetylaci lysinu v pozici 9 u H3 histonu po inkubaci s TSA. V nepřítomnosti TSA ale tato modifikace detekovat nešla. To je trochu zarážející, protože jak píší na předešlých stránkách, tak u MH1 kmene bylo dříve ukázáno, že u gliálních buněk dochází k detekovatelné acetylaci H3 histonu i pokud TSA přidán nebyl (Kim et al., 2003). Možným vysvětlením by mohl být fakt, že v prvním článku nebylo uvedeno jakou acetylaci na H3 histonu rozeznává použitá protilátka při imunoprecipitaci, a tudíž by zde mohl pramenit důvod v rozdílu výsledků. Krom toho autoři zkoušeli, jestli k této acetylaci stačí samotný protein NF- κ B p65, jehož koncentraci zvýšili opět pomocí expresního plazmidu. Bez přidání TSA ale nebylo možno detekovat žádnou acetylaci na histonu H3 (Wollebo et al., 2013). To je trochu zarážející vzhledem ke všem předešlým dílčím výsledkům, které autoři získali. I přesto, že zvýšení koncentrace NF- κ B p65 prokazatelně vede ke zvýšení aktivity promotorů JCPyV, zřejmě to není způsobeno zvýšenou acetylací histonů a celý systém je tedy mnohem složitější než si myslíme. Autoři kromě toho též vyslovili hypotézu, že k acetylaci možná dochází jen velmi lokálně a její detekce proto nebyla možná (Wollebo et al., 2013).

V následujících letech autoři pokračovali v rozšiřování jimi získaných dat, ale spíše než aby se věnovali podrobněji histonovým modifikacím, zaměřili se více na samotný NF- κ B p65. Ten totiž může být i sám o sobě acetylován pomocí p300 a to na lysinech 218, 221 a 310 (Chen et al., 2002). Důležitost acetylce lysinů 218 a 221 se nakonec potvrdila i pro vazbu proteinu NF- κ B p65 do KB elementu JCPyV (Wollebo et al., 2015). Zvýšená aktivita virových promotorů po inhibici histon deacetyláz tedy nemusí být primárně založena jenom na hyperacetylaci histonů, ale zřejmě i na zvýšené acetylaci dalších proteinů, mezi které evidentně patří i NF- κ B p65 (Wollebo et al., 2015). Kromě toho též ukázali, že se na acetylované lysinové zbytky proteinu NF- κ B p65 váže a dále stimuluje transkripci z virových promotorů i tzv. protein Brd4 (Wollebo et al., 2016), o němž je známo, že dokáže regulovat transkripci skrze RNA polymerázu II (Devaiah et al., 2012; Jang et al., 2005; Yang et al., 2005) a že dokáže i acetylovat histony (Devaiah et al., 2016).

3.4. Profil histonových modifikací pozorovaných u polyomaviru BK

Doposud zřejmě nejkomplexnější a nejpodrobnější analýza histonových posttraslačních modifikací polyomavirů byla popsána u lidského polyomaviru BK (BKPyV), který je zodpovědný za nefropatii u pacientů po transplantaci ledvin (Gardner et al., 1971). K získání těchto velmi podrobných dat přitom byla použita moderní metoda hmotnostní spektrometrie. Mapování posttraslačních modifikací se též zabývalo histony z infikovaných Vero buněk, které porovnávalo s modifikacemi histonů BKPyV, jež byly přítomné ve virionu. Výsledná analýza pak zahrnovala všechny 4 histony, jež tvoří jádro nukleosomu, a jejich různě modifikované varianty, které byly separovány pomocí TAU-PAGE elektroforézy.

I v případě této analýzy byla potvrzena hyperacetylce polyomavirového chromatinu, tentokrát u BKPyV. Rovněž se ukázalo, že kromě hyperacetylce jsou histony BKPyV i více methylovány ve srovnání s těmi hostitelskými (Fang et al., 2015). V této publikaci byly kromě methylace a acetylce virových histonů mapovány i další typy modifikací jako například fosforylace, ubiquitinylation či formylace. Vzhledem k rozsahu a komplexitě dat předložených ve článku, nemá dle mého názoru smysl, zde všechny tyto modifikace a jejich lokalizace v rámci histonů podrobně vypisovat. Pokud by se někdo o tato data skutečně zajímal, lze je všechny nalézt v publikaci Fang et al., 2015. Největší nevýhodou těchto opravdu podrobných dat však je to, že jsou to statické údaje a že nám neříkají nic o dynamičnosti změn či jejich funkci v průběhu infekčního cyklu BKPyV. Autoři i sami přiznali, že jejich článek a výsledky v něm obsažené by měly sloužit především jako základ pro navazující funkční analýzy.

3.5. Vliv malého t antigenu na histonové modifikace myšího polyomaviru

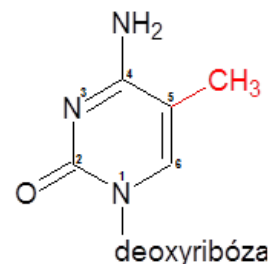
Jak jsem již psal v kapitole, která se zabývala histonovými modifikacemi viru SV40, tak hyperacetylace polyomavirového minichromosomu nebyla popsána pouze u viru SV40 (Coca-Prados et al., 1980; Chestier & Yaniv, 1979; La Bella & Vesco, 1980; La Bella et al., 1979; Vesco & Fantuzzi, 1982) ale také u myšího polyomaviru (MPyV). Zde bylo objeveno celkem zajímavé zjištění, že histony H3 a H4 asociované s virovou DNA mutant tohoto polyomaviru, jež nejsou schopny nádorově transformovat infikované buňky, nejsou tolik hyperacetylované ve srovnání s parentálním divokým typem (wt) MPyV (Schaffhausen & Benjamin, 1976). Tato neschopnost transformovat hostitelské buňky, jak bylo později ukázáno, byla způsobena mutacemi v sekvencích pro střední a malý t antigen (Carmichael & Benjamin, 1980; Hattori et al., 1979). V té době se však nevědělo, který z těchto dvou virových proteinů je zodpovědný za sníženou acetylaci virových histonů, či zda jsou za tento jev odpovědní oba tyto proteiny. Až v roce 2007 bylo pomocí série přesně definovaných mutantů zjištěno, že za absenci hyperacetylace virových histonů H3 a H4 může nefunkční malý t antigen (Dahl et al., 2007). Kromě toho byla u těchto mutantů pozorována i zvýšená frekvence výskytu trimethylace lysinu 9 a dimethylace lysinu 79 na histonu H3. Další modifikací, která se u mutantů vyskytovala ve zvýšené míře oproti wt MPyV, byla i fosforylace serinu 10 u histonu H3 (Dahl et al., 2007), což je modifikace související například s kondenzací chromatinu během mitózy (Hendzel et al., 1997). Důležitou otázkou, která z těchto pozorování vyvstala, je, jakým způsobem ovlivňuje malý t antigen modifikace virových histonů v průběhu infekce? I když přesný mechanismus tohoto procesu nebyl v roce 2007 zjištěn, tak na základě různých pozorování autoři dospěli k závěru, že hlavní roli zřejmě hraje to, jakým způsobem malý t antigen ovlivňuje průběh buněčného cyklu během infekce.

Jak wt MPyV, tak mutant s defektním malým t antigenem byly schopny donutit infikované buňky vstoupit do S fáze díky interakci velkého T antigenu a pRb (Freund et al., 1994). Následný postup buněčným cyklem se však mezi mutantem a wt virem lišil. Zatímco wt MPyV dokázal udržet infikované buňky v S fázi až do konce infekce, tak mutant s defektním malým t antigenem předčasně opustila S fázi (oproti wt viru) a dokončila produkci nových virionů až v G2 fázi (Dahl et al., 2007). Jak již bylo jednou zmíněno v kapitole o viru SV40, tak zvýšená acetylace histonu H4 provází replikaci DNA, k níž dochází v S fázi buněčného cyklu (Jasencakova et al., 2000). Naopak k fosforylaci serinu 10 histonu H3 dochází před vstupem do mitózy v pozdní G2 fázi (Hendzel et al., 1997), což by mohlo odrážet skutečnost, že mutant s defektním malým t antigenem, která měla zvýšenou frekvenci fosforylace tohoto serinu, dokončovala maturaci virionů právě v G2 fázi (Dahl et al., 2007). Malý t antigen tedy zřejmě přímo neinteraguje s enzymy, jež provádějí posttranslační modifikace histonů, ale spíše ovlivňuje jejich koncentraci a funkci tím, že zastavuje infikované buňky v S fázi skrze modulaci aktivity svého buněčného interakčního partnera, proteinu fosfatázy 2A (PP2A, Pallas et al., 1990).

4. Methylace DNA polyomavirů

4.1. Úvod k methylaci DNA u vyšších eukaryot

Methylace DNA je jednou z nejhojnějších kovalentních modifikací DNA a u naprosté většiny vyšších eukaryot (zejména u savců) je tato modifikace velmi často spojena s represí genové exprese (Yeivin & Razin, 1993). Majoritní nukleotidovou bází, která je methylována u savců, je cytosin na uhlíku číslo 5 (obrázek č. 7) vyskytující se v tzv. CpG dinukleotidu (Doskočil & Šorm, 1962).



Obrázek č. 7 – Struktura 5-methylcytosinu

V savcích organismech v současné době rozeznáváme zejména tři typy DNA methyltransferáz. Dva z těchto enzymů, DNA methyltransferázu 3a a 3b (DNMT3a, DNMT3b), označujeme za takzvané *de novo* methyltransferázy. Třetí z těchto enzymů, kterým je DNA methyltransferáza 1 (DNMT1), naopak označujeme jako maintenance (v hrubém překladu jako udržovací) methyltransferázu díky tomu, že má vyšší afinitu k hemimethylované DNA (Jeltsch, 2006). Kromě těchto 3 enzymů byly identifikovány i další 2 proteiny příbuzné k již zmíněným methyltransferázám, označované jako DNMT2 (Okano et al., 1998) a DNMT3L (Aapola et al., 2000).

Existují v zásadě dva mechanismy, jakými může buňka skrze methylaci cytosinu ovlivnit genovou expresi. Prvním z nich je inhibice vazby transkripčního faktoru na DNA způsobená stérickým bráněním methylové skupiny (dobré review, Attwood et al. 2014). Tento mechanismus represe transkripce byl prokázán např. u transkripčního faktoru AP-2 (Comb & Goodman, 1990) a onkoproteinu c-Myc (Prendergast & Ziff, 1991). Kromě toho je 5-methylcytosin často přítomen i v Z konformaci DNA (Behe & Felsenfeld, 1981), která nemusí být rozeznatelná transkripčními faktory. Druhou možností, jak lze pomocí methylace ovlivnit genovou expresi, je změna ve struktuře chromatinu. Existuje totiž řada 5-methylcytosin vazebných proteinů, jež dokáží interagovat s řadou chromatin remodelujících faktorů a tím ovlivnit transkripci na úrovni kondenzace chromatinu. Je také nutno podotknout, že ne vždy musí methylace DNA končit represí transkripce (užitečné review, Bogdanović et al. 2009).

4.2. Suprese CpG dinukleotidů v polyomavirových genomech

Aby vůbec mohl jakýkoliv organismus využívat regulaci genové exprese pomocí methylace DNA, musí logicky nejdříve vůbec obsahovat vhodná místa, která by mohla být methylována. To samé platí i v případě virů, ať už je každý z nás považujeme za živé organismy či nikoliv. U polyomavirů, podobně jako u buněk obratlovců, které jsou jejich přirozeným hostitelem, je, jak jsem již zmiňoval v minulé kapitole, jedinou methylovanou bází v DNA cytosin, nacházející se v CpG dinukleotidu (Doskočil & Šorm, 1962). Pokud se ale podíváme na DNA sekvence různých polyomavirů můžeme si okamžitě všimnout až podezřele nízkého počtu CpG dinukleotidů

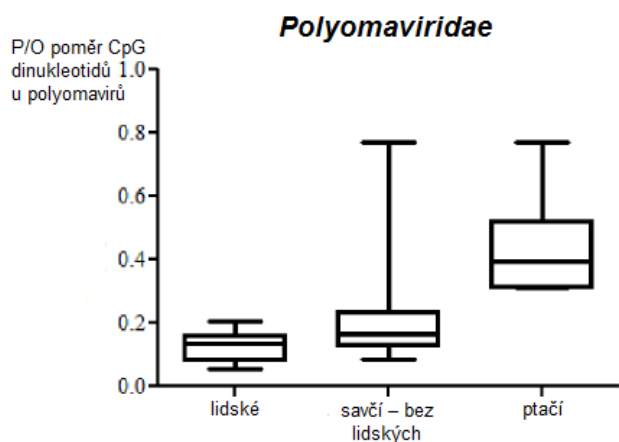
přítomných ve virových genomech. Například SV40 (AC číslo NC_001669 v databázi GenBank) by měl na základě délky svého genomu, která činí 5 243 párů bází, a procenta GC párů (41 %) obsahovat dle očekávání zhruba 218 CpG nukleotidů. Ve skutečnosti však obsahuje pouze 27 CpG dinukleotidů, tedy jen přibližně 12 % oproti očekávanému počtu (White et al., 2009). U lidských polyomavirů je tato situace dokonce ještě o něco extrémnější.

V genomu BKPyV (AC číslo DQ305492) se v genomu s délkou 5 190 párů bází nalézá pouze 14 CpG dinukleotidů (Chang et al., 2011) a podobně tomu je i u JCPyV (AC číslo NC_001699), který má na 5 130 párů bází pouze 16 CpG dinukleotidů (White et al., 2009). V roce 1994 byla množství CpG dinukleotidů analyzována v genomech zhruba 80 virů a bylo ukázáno, že téměř u všech virů, jejichž genom byl menší či roven 30 000 párům bází, dochází k potlačení výskytu CpG dinukleotidů (Karlin et al., 1994). Tento jev však nebyl omezen pouze na DNA viry, ale postihoval i viry s DNA intermediátem (tedy retroviry či virus hepatitidy B) a klasické RNA viry. Zajímavým faktem však je, že u vybraných zástupců čeledi *Polyomaviridae*, byl výskyt CpG dinukleotidů nejvíce potlačen (Karlin et al., 1994).

Další podobná analýza vyšla v roce 2015 a její autoři si vzali za cíl blíže se podívat na supresi CpG dinukleotidů u virových čeledí *Polyomaviridae* a *Papillomaviridae*. Při této analýze bylo použito celkem 183 kompletních sekvencí virových genomů, z čehož 56 jich bylo polyomavirových. I v této publikaci autoři potvrdili výsledky z minulých let, kdy ukázali, že CpG je nejméně často se vyskytujícím dinukleotidem přítomným v genomech virů obou sledovaných čeledí, přičemž mnohem extrémnější suprese jeho výskytu se opět ukázala být u polyomavirů (Upadhyay & Vivekanandan, 2015). Významné rozdíly ve frekvenci výskytu CpG dinukleotidu ale byly pozorovány i v genomech virů v rámci samotné čeledi *Polyomaviridae*. Například se ukázalo, že u ptačích polyomavirů není tolik potlačen výskyt CpG oproti jejich savčím příbuzným (obrázek č. 8). Například husí polyomavirus (AC číslo NC_004800) obsahuje na 5 256 párů bází 95 CpG dinukleotidů. Podobně je na tom i pěnkačví polyomavirus (AC číslo KT302407), který obsahuje 72 CpG dinukleotidů na 5 172 párů bází. Naopak u lidských polyomavirů byla ze všech analyzovaných virů nejvíce potlačena frekvence výskytu CpG dinukleotidů, což ukazují i počty CpG u BKPyV a JCPyV zmíněné v předchozím odstavci (Upadhyay & Vivekanandan, 2015). Možností jakým lze tento fenomén vysvětlit se nám naskytuje hned několik.

Jedna z nejočividnějších možností spočívá v tom, že se tímto jevem polyomaviry jednoduše brání před umlčením genové exprese pomocí methylace DNA, kterou by mohla zprostředkovat hostitelská buňka (White et al., 2009). Zde by mohl kořenit i důvod v rozdílu ve frekvenci výskytu CpG dinukleotidu mezi savčími a ptačími polyomaviry. Ptačí buňky totiž bývají méně methylované než buňky savčí, což bylo ukázáno na buňkách kuřete (Xu et al. 2007; Li et al. 2011). Ptačím polyomavirům tedy nemusí hrozit tak vysoké riziko methylace CpG

dinukleotidu, které by mohlo vyústit k utlumení genové exprese, a tudíž se u nich tento dinukleotid může vyskytovat ve vyšší frekvenci než u savčích polyomavirů.



Obrázek č. 8 – Grafické znázornění výskytu CpG dinukleotidů pomocí P/O poměru u různých polyomavirů v závislosti na typu hostitele.

P/O poměr značí poměr Pozorovaných CpG vůči Očekávaným CpG na základě velikosti genomu a procentuálního obsahu GC párů. P/O poměr s hodnotou 1 by tedy znamenal, že na 1 očekávaný CpG jsme v genomu určitého polyomaviru 1 CpG našli. Vyznačené obdélníky jsou oblasti s intervalem spolehlivosti 95 % pro každou z uvedených skupin, zatímco čárka uvnitř obdélníku značí průměr celé skupiny. Na základě grafu vidíme, že u všech skupin je výskyt CpG nukleotidu potlačen.

Převzato a upraveno z publikace Upadhyay & Vivekanandan 2015.

Další možností, která je též spojena s methylací DNA, je nestabilita genetické informace způsobená spontánní deaminací 5-methylcytosinu. V průběhu evoluce by tímto způsobem mohlo postupně dojít k vymizení CpG dinukleotidů z polyomavirových genomů a jejich nahrazení za TpG (ve stejném vlákně) či za CpA (v komplementárním vlákně). Tato varianta je též v souladu s rozdílem ve frekvenci výskytu CpG mezi savčími a ptačími polyomaviry. Jestliže totiž má DNA ptačích polyomavirů menší šanci být methylována, je i menší šance, že dojde k deaminaci 5-methylcytosinu na thymin, a tudíž nedochází k tak silné selekci proti výskytu CpG ve virových genomech. Analýza z roku 2015 však zpochybňuje tuto možnost, neboť když se u polyomavirů srovnala míra ztráty výskytu CpG dinukleotidu s mírou zisku TpG či CpA, nebyla zde významná korelace obou hodnot (Upadhyay & Vivekanandan, 2015).

Deaminace 5-methylcytosinu tedy zřejmě neovlivňuje frekvenci výskytu CpG dinukleotidu u polyomavirů. Dokonce to vypadá jakoby polyomaviry potlačily výskyt CpG dinukleotidů právě proto, aby nedocházelo k mutacím v kódujících oblastech vlivem již zmíněné deaminace. Příkladem může být aminokyselina arginin, která má ve 4 z 6 tripletů, jež ji kódují, CpG. Všechny čtyři tyto kodony se u ale u analyzovaných polyomavirů vyskytovaly s nižší frekvencí než zbylé dva, které CpG neobsahují (Upadhyay & Vivekanandan, 2015). U argininu je zejména problematická mutace kodonu CGA, kdy po deaminaci 5-methylcytosinu vzniká stop kodon TGA. Tato mutace bývá například častá v genu pro srážecí faktor VIII způsobující nemoc zvanou hemofilie A (Yousoufian et al., 1986). Výskyt synonymních kodonů obsahujících CpG však nebyl potlačen pouze ve vztahu k argininu, ale byl pozorován i u aminokyselin alaninu, prolinu, serinu a threoninu. Samozřejmě je zde možné argumentovat, že preference pro kodony bez CpG je jednoduše způsobena právě tím, že virus má nízkou frekvenci jejich výskytu. Při analýze polyomavirových genomů se však ukázalo, že tento bias

ve využití kodonů se uplatňuje spíše v protein kódujících oblastech a nikoliv v oblastech nekódujících (Upadhyay & Vivekanandan, 2015). Tato „translační selekce“ tedy zřejmě může chránit úspornou genetickou informaci polyomavirů před mutacemi způsobenými deaminací 5-methylcytosinu.

V neposlední řadě by roli v úbytku CpG dideoxynukleotidů mohla hrát i ochrana před imunitním systémem hostitele. U krátkých oligodeoxynukleotidů obsahujících nemethylovaný CpG je totiž známo, že dokážou aktivovat TLR9 (Toll-like receptor 9, Hemmi et al. 2000), a tím stimulují imunitní odpověď prostřednictvím plasmacytoidních dendritických buněk (Krug et al., 2001). Míra této stimulace závisí na celkovém motivu oligodeoxynukleotidů, která je kromě přítomnosti CpG podmíněná i přítomností různých dalších deoxynukleotidů (Krieg, 2002), a je často i druhově specifická (Hartmann & Krieg, 2000). Při pohledu na omezený počet CpG přítomných v genomu viru SV40 a JCPyV nebyly pozorovány žádné stimulační motivy v okolí CpG dinukleotidů, zatímco u myšího polyomaviru (MPyV) byl identifikován pouze jeden stimulační motiv (Hoelzer et al., 2008), což je pořád relativně málo ve srovnání s tím, že MPyV ve svém genomu obsahuje 96 CpG dinukleotidů (M. Graessmann et al., 1983). Tento fakt by mohl mít i vliv na patologii polyomavirů, neboť je známo, že lidské BKPyV a JCPyV způsobují ve většině případů chronické infekce (Taguchi et al., 1982), zatímco infekce ptačími polyomaviry obsahujícími více CpG dinukleotidů jsou naopak většinou spojeny s vážnou akutní infekcí (Bernier et al., 1981; Bozeman et al., 1981; Guerin et al., 2000). U ptáků však nejsou krátké oligodeoxynukleotidy obsahující CpG rozeznávány TLR9 ale tzv. TLR21 (Keestra et al., 2010). Zda je však potlačení výskytu CpG dinukleotidů u polyomavirů skutečně spojeno s imunitním systémem hostitele doposud známo není.

4.3. Vliv *in vitro* methylace na genovou expresi polyomavirů

V roce 1965 byl publikován článek, jehož cílem bylo popsat vliv infekce myším polyomavirem (MPyV) na hypermethylaci DNA u ledvinných epiteliálních buněk z myši. Z výsledků jejich experimentů, kdy se pozorovala míra inkorporace tritiem (³H) značené methylové skupiny z L-methioninu do DNA, autoři dospěli k několika závěrům. Pro nás však nejdůležitější závěr byl, že i v DNA izolované z virionů byl přítomný 5-methylcytosin. Z naměřených hodnot radioaktivity vyplývalo, že virus obsahoval na 1000 páru bází zhruba jen desetinu množství značeného 5-methylcytosinu oproti hostitelské DNA (Winocour et al., 1965). Toto pozorování je v souladu s faktem, který byl popsán v předchozí podkapitole a který poukazuje na supresi CpG dinukleotidů v polyomavirových genomech (Karlin et al., 1994; White et al., 2009). Tato publikace z roku 1965 však pouze poukazuje na to, že zřejmě dochází k methylaci cytosinu na uhlíku číslo 5, nikoli však na roli této methylace v infekčním cyklu viru.

Snaha pochopit vliv methylace na virovou expresi následně vedla k pokusům s *in vitro* methylací celých polyomavirových genomů. Bylo ukázáno, že pokud dojde k arteficiální methylaci DNA MPyV a viru SV40 pomocí krysí DNA methyltransferázy, a následně k mikroinjekci takto

upravené DNA do jader 5 vybraných buněčných linií (opičí ledvinné TC7 a CV1 linie, kryší 52.2 fibroblasty, myši 3T6 fibroblasty a primárních myších ledvinných epiteliálních buněk), nedochází ve srovnání s kontrolou k žádné výrazné změně v expresi časných genů (M. Graessmann et al., 1983). Samozřejmě by mohla vyvstat otázka, zda při mikroinjekci methylované DNA nedochází nejdříve k demethylaci DNA a až potom k normální expresi časných genů či zda pozorovaný projev není způsoben expresí z nových virových genomů.

Jedna z těchto otázek byla vyvrácena pokusem, kdy byl do média k infikovaným buňkám přidán 1- β -D-arabinofuranosylcytosin. Tento inhibitor zablokoval replikaci veškeré DNA a tím tedy zabránil i vzniku nových „nemethylovaných“ virových DNA molekul. To však ve výsledku neznamenal pro expresi časných genů žádnou změnu oproti kontrole (M. Graessmann et al., 1983). Otázka aktivní demethylace virové DNA byla vyřešena tím, že po zablokování replikace byla v určitých časových intervalech po injekci (až do doby 20 hodin po injekci) izolována veškerá virová DNA a analyzována na přítomnost 5-methylcytosinu. Výsledná analýza neprokázala demethylaci virové DNA. Na základě tohoto pokusu bychom tedy mohli říct, že časné geny MPyV a viru SV40 jsou zřejmě vůči jakékoliv methylaci necitlivé (M. Graessmann et al., 1983).

V případě exprese pozdních genů nedošlo u hypermethylované DNA též k žádným viditelným změnám oproti kontrole. Problém s interpretací tohoto výsledku je však v tom, že exprese pozdních genů je úzce spjata s replikací virové DNA (Tooze, J., 1980). To bylo ukázáno i v případě, kdy byla zablokována replikace již zmíněným 1- β -D-arabinofuranosylcytosinem. Kromě inhibice replikace DNA totiž došlo i k zablokování exprese pozdních genů. Na základě tohoto faktu si tedy nemůžeme být jistí, zda pozdní geny nejsou výsledkem exprese nově replikované „nemethylované“ virové DNA (M. Graessmann et al., 1983).

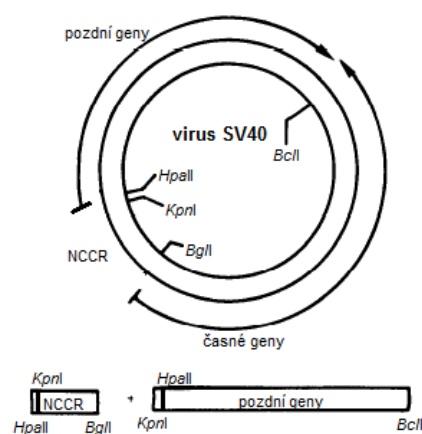
Zajímavý pokus, který byl aplikován na virus SV40, pak byla selektivní methylace jen jediného cytosinu pomocí *HpaII* methylázy. Tento enzym, který byl poprvé izolován z bakterie *Haemophilus parainfluenzae* (ATCC 49669), specificky methyluje cytosin uprostřed sekvence CCGG, kterou též rozeznává stejnojmenná restriční endonukleáza (Quint & Cedar, 1981). Virus SV40 obsahuje ve svém genomu pouze jediné takové místo a to až za promotorem pro pozdní geny v 5' nepřekládané oblasti (Fradin et al., 1982).

Pokud dojde ke specifické methylaci tohoto jediného CpG dideoxynukleotidu a následně k mikroinjekci upravené DNA do jader oocytů žáby *Xenopus leavis*, dochází ke snížení exprese pozdních genů až o 80% oproti kontrole, zatímco exprese časných genů touto methylací ovlivněna není (Fradin et al., 1982). Je pravdou, že pokus s mikroinjekcí savčího DNA viru do žabího oocyty je poněkud bizarní, avšak autoři příslušného článku byli s tímto expresním systémem spokojeni z několika důvodů. Zaprvé, exprese pozdních i časných genů viru SV40 byla v tomto expresním systému potvrzena již dříve (De Robertis & Mertz, 1977; Rungger & Türlér, 1978). Ale nejdůležitější důvod byla výhoda, která se skrývala v tom, že se DNA viru SV40 nedokáže i přes expresi pozdních genů v oocytech *Xenopus*

leavis replikovat (Harland & Laskey, 1980). To odstraní problém s tvorbou nových „nemethylovaných“ genomů SV40, které by mohly být zdrojem exprese pozdních genů. Aktivní demethylace se ani v tomto případě nepotvrdila po zpětné izolaci virové DNA (Fradin et al., 1982).

Na základě tohoto pokusu autoři navrhli teorii, která říká, že v časně fázi infekci dochází k methylaci oblastí, které se podílejí na expresi pozdních genů. Tato methylace je následně v průběhu infekčního cyklu odstraněna, buď aktivní demethylací či pasivně, díky DNA replikaci, což má za příčinu přechod do pozdní fáze infekčního cyklu a tvorbu produktů pozdních genů (Fradin et al., 1982). Tato teorie však dále nebyla nikdy experimentálně ověřena. Dokonce se objevily experimenty, které zpochybnilly vliv této methylace (v *HpaII* restrikčním místě) na expresi pozdních virových genů u savčích buněk. Problém s dokázáním tohoto argumentu, ale tkvěl v tom, že v savčích buňkách je exprese pozdních genů, jak jsme již dříve avizovali, úzce spjata s replikací virové DNA (Tooze, J., 1980), jež ve výsledku může vést ke ztrátě umělé methylace.

S celkem elegantním řešením, jak tento problém obejít a otestovat v savčích buňkách vliv methylace *HpaII* restrikčního místa viru SV40, přišla skupina autorů, jež předtím publikovala již zmíněnou práci, která ukázala, že časně geny MPyV a viru SV40 nejsou závislé na methylaci (M. Graessmann et al., 1983). Tito autoři s využitím několika restrikčních enzymů rozštěpili genom viru SV40 na celkem 3 oblasti, které odpovídaly nekódující kontrolní oblasti (NCCR) a časným a pozdním genům (obrázek č. 9). Následně vzali fragment, který obsahoval oblast s pozdními geny a ligovali ho spolu s nekódující kontrolní oblastí tak, aby ve výsledku byla část fragmentů pozdních genů pod kontrolou časného promotoru, jež se v NCCR nachází. Takto upravená DNA potom byla mikroinjekcí vpravena do jader jak permissivních ledviných buněk afrického kočkodana (TC7 buněk) tak do nepermissivních primárních ledviných buněk z novorozené myši.



Obrázek č. 9 – Restrikční mapa viru SV40 ve vztahu k funkční organizaci virového genomu.

Vyznačené DNA fragmenty, nacházející se pod restrikční mapou, byly použity k ligaci a následné mikroinjekci do TC7 buněk a ledviných epiteliálních buněk myši.

Převzato a upraveno z publikace Graessmann et al. 1984.

První známky exprese pozdních genů byly pozorovatelné již po 6 hodinách od mikroinjekce DNA, avšak maximum exprese nastalo až po 20 hodinách, kdy bylo zhruba 25-30 % obou typů buněk pozitivní na produkty pozdních genů. Víceméně ke stejnému výsledku se dospělo, i pokud byly obě buněčné linie vystaveny opět 1-β-D-arabinofuranosylcytosinu, jež působí jako inhibitor replikace DNA. To tedy potvrzuje, že v tomto případě exprese pozdních genů je nezávislá na replikaci virové DNA (M. Graessmann et al., 1984). Je sice pravdou, že 25-30 % pozitivních buněk se může zdát relativně málo vůči všem buňkám, které byli mikroinjikovány virovou DNA. Pokud ale vezmeme

v úvahu, že autoři do buněk nevpiovali čistý rekombinantní fragment ale rovnou ligační směs, dojdeme k závěru, že 25-30 % je celkem slušné číslo. Nakonec autoři vzali fragment obsahující pozdní geny (tedy *KpnI/BclI* fragment) a metylovali již zmíněné jedinečné *HpaII* restrikční místo nadbytkem *HpaII* methylázy. Následně tento metylovaný fragment znovu ligázou spojili s NCCR fragmentem (nemetylovaným) a vstříkli opět do obou typů buněk za stejných podmínek. Ve výsledku ale nedošlo k žádné změně exprese u pozdních genů oproti nemetylované kontrole. Methylace CpG dinukleotidu v *HpaII* sekvenci tedy u savčích buněk nemá vliv na expresi pozdních genů. Nebo přesněji řečeno, nehraje roli v expresi pozdních genů, pokud jsou tyto geny pod kontrolou časného promotoru viru SV40 (M. Graessmann et al., 1984).

Poslední z řady experimentů, jež se zabývaly *in vitro* methylováním polyomavirových genomů, se opět vrátil k expresnímu systému oocytů žaby *Xenopus laevis*. I v tomto případě byl k pokusu vybrán virus SV40, který byl ošetřen dvěma způsoby methylace. V prvním případě byl genom viru SV40 metylován *HpaII* a *HhaI* DNA methylázami, jež metylovaly 3 CpG dinukleotidy v oblasti pozdních genů, a mikroinjikován do jader žabích oocytů. V tomto případě nedošlo oproti kontrole k žádné změně v expresi jak časných tak pozdních genů (Götz et al., 1990). To je ovšem v rozporu s předešlými výsledky, které poukazovaly na to, že při methylaci unikátního restrikčního *HpaII* místa, dochází ke snížení exprese pozdních genů až o 80 % (Fradin et al., 1982). Důvody tohoto rozkolu v pozorování dále ale prozkoumány nebyly. V druhém případě byly veškeré CpG dinukleotidy přítomné v DNA viru SV40 metylovávány DNA methyltransferázou z krysích jater a celá DNA byla následně opět vstříknuta do jader oocytů *Xenopus laevis*. U tohoto druhého typu methylace už ale oproti kontrole byly viditelné změny v expresi virových proteinů. Například pozdní transkripce byla v oocytech téměř kompletně potlačena (Götz et al., 1990). Také však došlo k částečnému utlumení časné transkripce, o které se do té doby předpokládalo, že není ovlivnitelná methylováním (M. Graessmann et al., 1983). Toto objevení, však nebylo prvním, které zpochybnilo nezávislost exprese časných genů na methylaci, a blíže se k tomuto tématu dostanu v další kapitole.

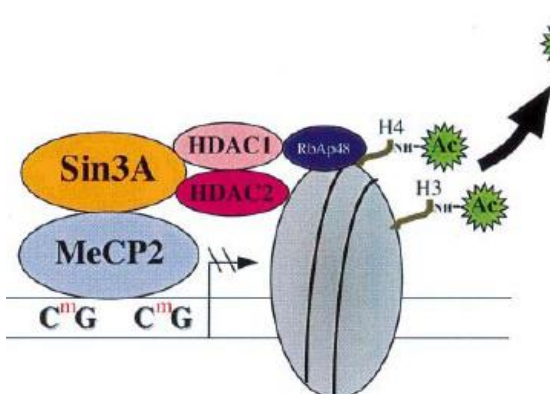
Zpátky však k pozdním genům. Po zjištění, že kompletní methylace CpG dinukleotidů vede k potlačení exprese pozdních genů v žabích oocytech, bylo dalším cílem určit, která methylační místa jsou hlavní příčinou této represe. Z 27 CpG dinukleotidů, které se vyskytují v genomu viru SV40 (White et al., 2009), se jich valná většina vyskytuje v jednom ze dvou velkých shluků. První z těchto shluků se nachází v těsné blízkosti počátku replikace virové DNA, zatímco druhý shluk se nachází v 5' oblasti sekvence kódující pozdní geny (zde se vyskytuje již několikrát zmíněné *HpaII* restrikční místo). S pomocí správně vybraných restrikčních enzymů bylo možné tyto shluky CpG dinukleotidů z DNA viru SV40 izolovat a *in vitro* metylovat krysí DNA methyltransferázou. Metylované fragmenty DNA pak byly zpětně ligovány do virového genomu a mikroinjikovány do oocytů. Ve výsledku bylo zjištěno, že ke kompletnímu potlačení pozdní transkripce, která byla u žabích

oocytů pozorována, je potřeba methylace obou těchto shluků CpG dinukleotidů, neboť methyloci každého zvláště expresi pozdních genů příliš neovlivní (Götz et al., 1990).

Při zpětném pohledu na všechny zde zmíněná výsledky je těžké stanovit nějaký jednoznačný závěr. Řada výsledků *in vitro* methyloci polyomavirové DNA ukazuje trochu jiné výsledky v závislosti na využitém expresním systému, či si dokonce některé výsledky vyloženě odporují (viz *HpaII* restrikční místo viru SV40). Navíc u výsledků týkajících se vlivu *in vitro* methyloci na virovou expresi není nikdy jistota, že k podobné regulaci exprese skutečně dochází i za fyziologických podmínek uvnitř buňky.

Velkou roli při možné regulaci exprese polyomavirových genů pomocí methyloci by mohla hrát i samotná přítomnost histonů a dalších proteinů asociovaných s virovou DNA. Bylo totiž ukázáno, že pokud byly do společné části intronů časných genů viru SV40 klonovány krátké úseky genu pro thymidin kinázu viru HSV (Herpes Simplex Virus), u kterého byla prokázána možnost represe pomocí methyloci (Buschhausen et al., 1985), nebyla v čase 24 a 48 hodin po mikroinjekci do krysích buněk (rat2) pozorována žádná výrazná změna v expresi časných genů u methylované a nemethylované DNA (A. Graessmann et al., 1994). Po delší době však syntéza časných genů ustala. Autoři tohoto experimentu posléze vyslovili hypotézu, že za tento jev může tvorba chromatinu asociovaného s virovou DNA. Tuto hypotézu potvrdili, když následně *in vitro* připravili z histonů a modifikované DNA viru SV40 kruhové minichromozomy, které posléze opět mikroinjikovali do krysích buněk. V tomto případě u viru SV40 s methylovaným fragmentem nastala inhibice exprese časných genů téměř okamžitě (A. Graessmann et al., 1994).

Roli v tomto jevu by mohly hrát už již v úvodu zmíněné proteiny vázající 5-methylcytosin. Příkladem takového proteinu je např. i MeCP2, který byl identifikován jako interakční partner proteinů Sin3A a histon deacetyláz (HDACs), spolu s kterými je schopen reprimovat transkripci DNA (Jones et al., 1998; Nan et al., 1998). Tvorba tohoto komplexu (obrázek č. 10) by tedy mohla tvořit jakousi spojku, která by přemostovala informaci o methyloci cytosinu do následné posttranslační modifikace histonů (review shrnující tyto poznatky, Razin 1998).



Obrázek č. 10 – Model proteinového komplexu přenášející informaci o methyloci cytosinu do posttranslační modifikace přilehlých histonů.

Vazba proteinu 2 vázající methylovaný CpG (MeCP2) na 5-methylcytosin je schopna vyvolat vazbu dalších proteinů, jakými jsou např. proteinový korepresor Sin3A a histondeacetylázy 1 a 2 (HDAC 1/2). Tyto deacetylázy potom mohou prostřednictvím proteinu RbAp48 katalyzovat odštěpení acetylových skupin z lysinových zbytků na N-koncích H3 a H4 histonů, což ve výsledku vede ke kondenzaci chromatinu, která znemožní vazbu transkripčních faktorů na DNA.

Převzato a upraveno z publikace Razin 1998.

4.4. Methylace integrované formy myšího polyomaviru v transformovaných buňkách

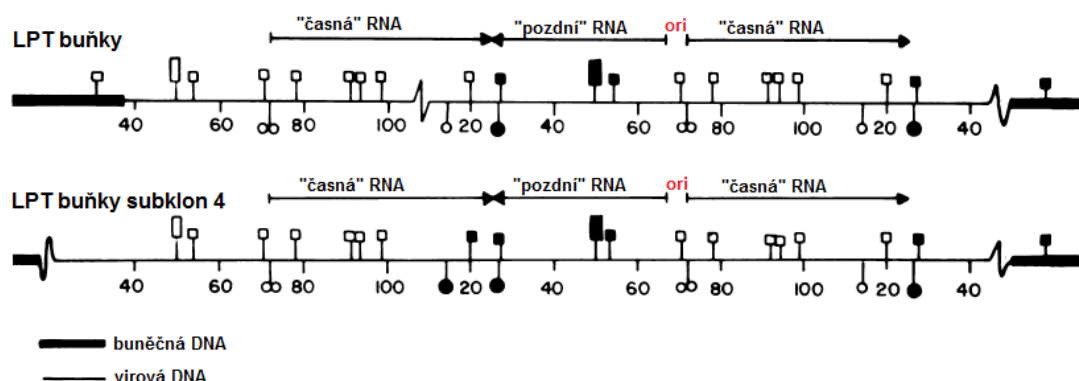
Další možností jak studovat vliv methylace cytosinu na genovou expresi polyomavirů je studium buněk, které pro virus nejsou permissivní a jsou jeho přítomností nádorově transformované. V takovýchto buňkách totiž velmi často dochází k expresi časných genů, nikoliv však k expresi genů pozdních, jako je tomu i u tzv. LPT buněk (Manor & Kamen, 1978). Tyto buňky jsou krysí linií, která byla nádorově transformována kmenem myšího polyomaviru (MPyV) tvořícím velké plaky (large plaque strain) (Fogel & Sachs, 1969). Celý genom MPyV je v těchto buňkách integrován v lineární formě do jediné části chromozomu, avšak počet integrovaných genomů se v populaci jednotlivých LPT buněk vzájemně liší. Vždy jsou ale tandemově uspořádané v místě integrace (Mendelsohn et al., 1982).

Pro zjištění míry možné methylace integrovaného viru u těchto buněk byla použita dnes již zastaralá analýza pomocí restrikčních enzymů *HpaII* a *HhaI*. Oba tyto enzymy za normálních podmínek rozeznávají palindromy obsahující CpG dinukleotidy a štěpí tuto sekvenci pouze tehdy, když je nemethylovaná (McClelland, 1981). *HpaII* endonukleáza rozeznává sekvenci CCGG, zatímco endonukleáza *HhaI* rozeznává sekvenci GCGC. Normální MPyV obsahuje celkem 96 CpG dideoxynukleotidů (M. Graessmann et al., 1983), avšak integrovaná forma viru v LPT buňkách má mutaci v oblasti pro pozdní geny, která generuje další CpG rozeznávané *HpaII* endonukleázou (Manor, 1985). Nakonec tedy kombinací těchto dvou enzymů bylo možné zmapovat metylaci 13 z celkem 97 CpG dideoxynukleotidů. Pozici mapovaných CpG úseků a to, zda jsou v LPT buňkách methylované lze vidět na obrázku číslo 11.

V integrovaném polyomaviru byly díky restriktázám *HpaII* a *HhaI* identifikovány celkem čtyři CpG dinukleotidy, které byly methylované a které se vždy nacházely v oblasti odpovídající pozdním genům. Avšak pouze jeden z nich byl téměř vždy methylován. Jednalo se o CpG dinukleotid, který se nachází uvnitř sekvence rozeznávané enzymem *HpaII* ležící poblíž 3' konce pozdních genů. Ostatní tři CpG dinukleotidy byly v izolované DNA methylovány v různé míře. Pomocí enzymu *HpaII* byla rovněž detekována methylace cytosinu v hostitelské DNA hraničící s pravým okrajem integrovaného viru (Manor, 1985). Tyto poznatky naznačují, že zde je určitá korelace mezi methylací cytosinu a sníženou expresí pozdních genů, která byla u LPT buněk pozorována (Manor & Kamen, 1978). Snížená exprese by však mohla být pouze důsledkem toho, že nedochází k aktivní replikaci virové DNA. Jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole, tak transkripce pozdních genů je u polyomavirů úzce spojena s replikací virové DNA (Tooze, J., 1980). Pokud však LPT buňky ošetříme fyzikálními či chemickými mutageny jako například ultrafialovým světlem či mitomycinem c, dojde k vyštěpení MPyV z buněčné DNA a nástupu lytického cyklu (Fogel & Sachs, 1970). V této době dochází k replikaci kruhové virové DNA a expresi pozdních genů (Manor & Kamen, 1978; Manor et al., 1983). Analýza amplifikované virové DNA ukázala, že se methylační profil integrované a volné formy MPyV

příliš neliší. Autor článku však sám podotkl, že v době publikace neměl prostředky jak odlišit plně methylovanou a hemimethylovanou DNA. Rozdíl v takto modifikované DNA by též mohl být rozhodující v míře transkripce pozdních genů (Manor, 1985).

Ve vztahu k methylaci DNA integrovaného MPyV byl analyzován i tzv. subklon 4, odvozený z původní LPT linie. Subklon 4 měl na rozdíl od klasických heterogenních LPT buněk jasně definovaný počet integrovaných genomů MPyV, který čítal pouze 2 tandemově uspořádané kopie, a zároveň u něj nebyla možnost navodit lytický cyklus přidáním mutagenu, tak jak tomu bylo u mateřské linie (Manor et al., 1983). Výsledky analýzy subklonu 4 ukázaly přítomnost dalších dvou methylovaných cytosinů rozeznávaných enzymy *HpaII* a *HhaI*, které se nacházely v 3' oblasti časných genů MPyV, kde je kódován C- koncový úsek velkého T antigenu (obrázek č. 11). Methylace v této oblasti by dle autora mohla mít vliv na elongaci časně transkripce a mohla by vyústit v produkci zkrácené verze mRNA, která po sestřihu a následné translaci produkuje zkrácený nefunkční či částečně nefunkční velký T antigen, jenž není schopen po přidání mutagenu indukovat u subklonu 4 vstup do pozdní fáze (tedy nemůže započít replikaci virové DNA a expresi pozdních genů) na rozdíl od situace u původních LPT buněk (Manor, 1985). Tato autorova hypotéza však nebyla experimentálně podložena.



Obrázek č. 11 – Fyzikální mapa integrované formy myšího polyomaviru v LPT buňkách a subklonu 4 s polohou všech mapovaných CpG dideoxynukleotidů.

Symbol o značí pozici sekvence GCGC rozeznávanou restrikčním enzymem *HhaI*. Symbol □ pak značí sekvenci CCGG rozeznávanou enzymem *HpaII*. Značka □ symbolizuje též sekvenci rozeznávanou enzymem *HpaII*. Tato sekvence je ale výsledkem bodové mutace a je unikátní pro LPT buňky. Začernělé symboly jsou sekvence, které byly při analýze pozitivní na methylaci cytosinu v CpG dinukleotidu. Přerušení uprostřed čáry značící virovou DNA znamená místo inserce přímých tandemově uspořádaných virových genomů, jejichž počet se u různých buněk v LPT linii může lišit. Subklon 4 buněk LPT obsahuje vždy pouze 2 intaktní kopie MPyV, tak jak je vyznačeno na obrázku.

Převzato a upraveno z publikace Manor 1985.

Vztah mezi methylací integrovaného MPyV a expresí velkého T antigenu byl v odborné literatuře popsán ještě v jednom případě. Cílem dané práce však původně nebylo studovat methylaci integrovaného polyomaviru, ale popsat *in vitro* evoluci buněk transformovaných MPyV. Studované buňky, známé též jako A4 linie, vznikly transfekcí NIH 3T3 myších fibroblastů rekombinantním

plazmidem obsahujícím MPyV s termosenzitivní mutantou velkého T antigenu (Fried, 1965). Díky tomu, že byl virus naklonován do pML plazmidu přes *Bam*HI restrikční místo, které se nachází přímo uprostřed pozdních genů, čímž rozrušuje jejich čtecí rámec, nebyl virus schopen i přes permisivní podmínky myších 3T3 buněk završit svůj lytický cyklus produkcí infekčních virionů. Buňky tedy byly schopny exprimovat pouze časné geny a vykazovaly fenotyp transformovaných buněk (Liboi & Basilico, 1984). Při inkubaci v 39° C buňky A4 linie normálně syntetizovaly všechny 3 produkty časných genů, avšak pouze malý a střední t antigen byly v buňkách funkční. Když však byly buňky přeneseny

do teploty 33° C, došlo k produkci aktivního velkého T antigenu a k replikaci plazmidu obsahujícího virus. Velká většina buněk však následně zahynula. Vzhledem k tomu, že z virového genomu rekombinovaného s plazmidem nebylo možno syntetizovat produkty pozdních genů a tudíž vytvářet infekční viriony, autor předpokládal, že buňky pravděpodobně zabíjí nadměrná exprese časných genů či zátěž způsobená neustálou replikací plazmidu nebo kombinace obou. I přes smrt většiny buněk linie A4 jich však velmi malá část přežila přechod do 33° C a po 7 až 10 dnech se začaly aktivně dělit. Následná imunofluorescence u zotavené kultury ale ukázala, že i přes inkubaci v 33° C, která je permisivní pro funkci velkého T antigenu, byla jen pouhá 2 % buněk pozitivní na přítomnost tohoto proteinu. Právě dosažení tohoto výsledku bylo původním důvodem pro vznik dané práce. Již dříve totiž byl publikován článek, který popisoval podobnou selekci proti funkci velkého T antigenu u MPyV, ale jednalo se o selekci v krysích nádorových buňkách. U nich bylo ukázáno, že defekt v expresi velkého T antigenu je založen na přestavbě integrovaného MPyV (Dailey et al., 1982).

Jakým překvapením pak bylo zjištění, že potlačení exprese nejen velkého T antigenu ale i malého a středního t antigenu byla způsobena methylovaním integrovaného polyomaviru. Následné analýzy ukázaly, že k methylaci došlo v nekódující kontrolní oblasti (NCCR) MPyV. Přesnou polohu methylovaných cytosinů však autoři nezveřejnili. Definitivním důkazem hypermethylace časných genů, pak bylo ošetření methylovaných buněk 5-azacytidinem, který je syntetickým analogem cytidinu a zároveň funguje jako inhibitor methyltransferáz (Stresemann & Lyko, 2008). Po třech dnech od přidání inhibitoru bylo imunofluorescencí stanoveno, že zhruba u 50 % buněk v kultuře se obnovila exprese velkého T antigenu (Liboi & Basilico, 1984).

Celkově vzato však studium integrovaného MPyV nepřineslo definitivní odpovědi na otázku represe pozdních genů pomocí methylace. Opět se zpochybnil fakt, že časné geny MPyV jsou necitlivé vůči methylaci CpG dinukleotidů (Fradin et al., 1982; M. Graessmann et al., 1983) podobně jako v publikaci Götz et al. z roku 1990, o kterém jsem též psal v minulé kapitole. Experiment se subklonem 4 LPT buněk sice jednoznačně neprokázal vztah mezi methylací 3' oblastí časných genů a vlivu této modifikace na expresi velkého T antigenu či ostatních časných genů (Manor, 1985). Zato experimenty provedené s buněčnou linií A4 zcela jistě potvrzují, že hypermethylace nekódující kontrolní oblasti má u tohoto typu buněk za následek potlačení exprese časných genů (Liboi &

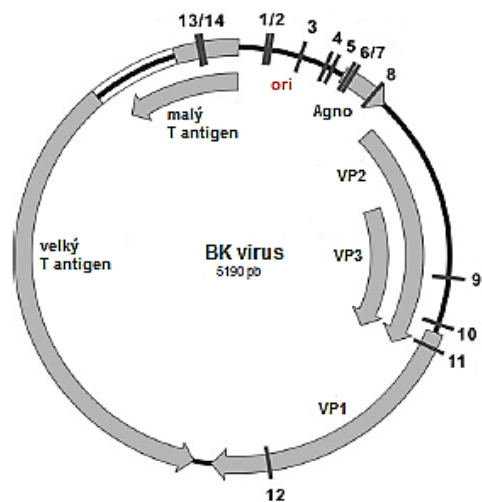
Basilico, 1984). Otázkou tedy je proč methylace u integrovaného MPyV dokáže zabránit časné transkripci, zatímco u volné kruhové DNA ne. Odpověď by mohla tkvít v samotné organizaci chromatinu. Jak již bylo zmíněno na předešlých stránkách, tak existuje celá řada 5-methylcytosin vazebných proteinů, jež dokáží v interakci s jinými proteiny ovlivnit strukturu chromatinu a tím regulovat genovou expresi (Bogdanović et al. 2009). Kromě těchto proteinů by možná u integrovaného polyomaviru mohla hrát roli na regulaci virové transkripce i struktura okolního buněčného chromatinu. Ta však ani v jednom případě nebyla blíže studována.

Tématu, kterému jsem se v této práci úmyslně vyhýbal, protože přímo nesouvisí s methylací polyomavírové DNA, je i vliv integrovaných polyomavirů na změny v „methyloemu“ transformovaných buněk. V tomto ohledu sice MPyV studován nebyl, ale jiné polyomaviry ano. Například u polyomaviru karcinomu Merkelových buněk bylo ukázáno, že v 51 % studovaných případů tohoto karcinomu byl hypermethylován promotor genu RASSF1A, který kóduje potenciální onkosupresor (Helmbold et al., 2009). Hypermethylace tohoto genu byla potvrzena i při studiu lidských mesotheliálních buněk transformovaných virem SV40 (Toyooka et al., 2002). Jakým mechanismem však polyomaviry mohou ovlivnit methylaci buněčných genů, přesně známo není. U polyomaviru BK (BKPyV) ale bylo ukázáno, že jeho velký T antigen dokáže zvýšit expresi DNA methyltransferázy 1 tím, že ovlivňuje interakci pRb s E2F (McCabe et al., 2006). Hluběji se vlivem mnoha virů na změny v epigenetických modifikacích transformovaných buněk, zabývá článek Minarovits et al., 2016.

4.5. Methylace v infekčním cyklu polyomaviru BK a ostatních polyomavirů

Doposud zřejmě jediná publikace, která by studovala reálné změny v methylaci polyomavirů, byla zaměřena na BKPyV a byla publikována v roce 2011. Tato studie pomocí bisulfitové metody (Frommer et al., 1992) mapovala změny v methylaci 14 CpG dinukleotidů přítomných v DNA sekvenci BKPyV, jejichž rozložení můžeme vidět na obrázku č. 12, v průběhu celého infekčního cyklu tohoto viru. Výsledná analýze však ukázala, že k žádné methylaci či změně v methylaci CpG úseků BKPyV nedochází. BKPyV tedy při produktivní infekci nevyužívá k regulaci exprese genů methylaci cytosinu v CpG dideoxynukleotidu (Chang et al., 2011).

Podobná situace se očekávala i u dalšího lidského polyomaviru jakým je JCPyV. Doposud se jeho vztahem k methylaci DNA však zabývala, alespoň co je nám



Obrázek č. 12 – Schéma rozložení 14 CpG dinukleotidů přítomných v genomu BK viru.

Jak můžeme vidět tak se CpG dinukleotidy nacházejí jak v oblasti pro časně a pozdní geny, tak v nekódující kontrolní oblasti (NCCR) BK viru.

Převzato a upraveno z Chang et al. 2011

známo, pouze jediná práce. Analyzována byla pouze nekódující kontrolní oblast (NCCR) JCPyV (kmen Mad-1), která byla klonována do dvou reportérových plazmidů s genem pro luciferázu a to tak, aby byl gen pro luciferázu v jednom případě pod kontrolou časného promotoru a v druhém pod kontrolou promotoru pozdního. Tyto plazmidy poté byly transfekovány do lidských oligodendrogliomových buněk linie TC620 a kultivovány v přítomnosti nebo absenci 5-azacytidinu jako inhibitoru methylace DNA. Výsledek byl takový, že při obou typech kultivace nebyl rozdíl v aktivitě enzymu luciferázy a tudíž, že methylace DNA nehraje roli v infekčním cyklu JCPyV (Wollebo et al., 2013). Nicméně analyzována byla pouze NCCR JCPyV a to ani ne v kontextu se zbytkem jeho genomu. Jak jsem již psal na předešlých stránkách, tak v případě *in vitro* methylace bylo ukázáno několik výsledků, které ukazují, že u polyomavirů mohou hrát roli v regulaci transkripce i CpG dinukleotidy přítomné v kódujících oblastech. Nicméně na základě analýzy BKPyV a nízkého počtu CpG dinukleotidů u obou těchto lidských polyomavirů se též přikláním k názoru, že methylace DNA nehraje roli při infekci JCPyV.

Studie methylace ve spojení s BKPyV je tedy doposud jediná práce, která přinesla přímé výsledky o změnách v methylaci CpG dinukleotidů v průběhu celé produktivní polyomavirové infekce. Ostatní publikace totiž vždy vycházely z experimentů, které studovaly vliv methylace na polyomavirovou expresi při arteficiálních podmínkách jako u *in vitro* methylací virové DNA nebo v nepermissivních podmínkách u integrované formy polyomaviru. Výsledky těchto pokusů, na základě informací z předešlých dvou kapitol, ale nepřinesly žádné jasné východisko týkající se vlivu methylace DNA na životní cyklus polyomavirů a hlavně nedošlo k prokázání, zda k takovým změnám v methylaci DNA vůbec dochází v infekčním cyklu, jenž končí produkcí nového virového potomstva. Jak již bylo řečeno, tak BKPyV tento způsob ovlivnění exprese nevyužívá (Chang et al., 2011). Ale jak je to u genomu myšího polyomaviru?

Experiment s inkorporací radioaktivně značené methylové skupiny z půlky 70. let minulého století ukazoval, že v DNA MPyV (izolované z virových částic) lze detekovat přítomnost 5-methylcytosinu (Winocour et al., 1965). Na základě tohoto experimentu to tedy vypadalo, že u MPyV zřejmě dochází k aktivní methylaci DNA. Možná se ale jednalo o chybu, protože při pokusu s *in vitro* methylací genomu MPyV, popsané v příslušné kapitole, byla rovněž analyzována DNA z virionu, která se ale v tomto případě ukázala být bez známky methylace (M. Graessmann et al., 1983), což je v přímém rozporu s pozorováním z půlky 70. let. Podle našeho názoru by možná bylo dobré na základě tohoto rozporu se znovu podrobně podívat na methylaci MPyV. Tento virus se totiž v některých ohledech výrazně liší od jiných, hlouběji prozkoumaných savčích polyomavirů. Ve vztahu k potenciální možné methylaci by se dalo zmínit, že tento virus například obsahuje mnohem více CpG dinukleotidů než bylo ukázáno být běžné pro jiné savčí polyomaviry (Upadhyay & Vivekanandan, 2015). Jeho genom s 5310 páry bází totiž obsahuje celkem 96 CpG dinukleotidů (M. Graessmann et al., 1983), což je podobné číslo jako u ptačích polyomavirů.

5. Závěr

Každý virus pro svou reprodukci vyžaduje molekulární mechanismy hostitelské buňky a obecně platí, že čím menší virus, tím více je na buňce závislý. Ani polyomaviry v tomto ohledu nejsou výjimkou. Kromě toho, že polyomaviry potřebují buněčné transkripční faktory a RNA i DNA polymerázy, využívají tyto viry k regulaci své genové exprese některé buněčné mechanismy, jako např. epigenetické modifikace. Alespoň tak tomu je u posttranslačních modifikací histonů virového minichromosomu, ke kterým prokazatelně u polyomavirů dochází v průběhu infekce. V tomto ohledu je nejprozkoumanějším zástupcem polyomavirů virus SV40, na kterém se v současné době provádí pokusy, jež nám přibližují, co se děje během infekce s virovým minichromosomem v jádře hostitelské buňky. Momentálně se například aktivně studuje, jaké modifikace jsou spojovány s represí časně transkripce, kterou je virus sám schopen regulovat pomocí velkého T antigenu. U SV40 se také ukázalo, že v infikovaných buňkách tvoří jeho minichromosomy odlišně modifikované epigenomy, které se zřejmě liší svou konkrétní funkcí v dané fázi infekce. Modifikace, které u polyomavirů pozorujeme, dokážou patrně tyto viry ovlivnit pomocí vlastních proteinů. Tento fakt byl ukázán u mutant MPyV, které byly defektní ve funkci malého t antigenu a jež se významně lišily v hyperacetylaci (a i jiných modifikacích) histonů oproti divokému viru.

Naopak methylace DNA zřejmě nehraje významnou roli v životním cyklu polyomavirů. Tyto viry totiž mají genomy, ve kterých se téměř nevyskytují CpG dinukleotidy, jež by mohly být cílem eukaryotních DNA methyltransferáz. Pro tvrzení, že polyomaviry během produktivní infekce nemethylují svou DNA, svědčí i pokusy s polyomavirem BK, u kterého bisulfitovou metodou tento typ modifikace potvrzen nebyl. Přesto ve starší literatuře existuje řada článků, jejichž výsledky získané při *in vitro* methylaci polyomavirových genomů svědčily o represí polyomavirové exprese v důsledku methylace DNA. Možná by proto nebylo špatné ještě jednou oblast methylací polyomavirových genomů prozkoumat s použitím současných metod a v *in vivo* systému. Problém se starší literaturou se vyskytuje i u studia integrovaných forem polyomavirů, jež jsou spojovány s výskytem nádorových onemocnění. Zde doposud existuje pouze jediná publikace z roku 1985, která se zabývala methylací integrovaného MPyV. V té době však z technických důvodů nebylo možné mapovat methylaci všech 96 CpG dinukleotidů v genomu MPyV. Tato oblast výzkumu by dle mého názoru zasloužila doplnění a rozšíření a to zejména proto, že integrované polyomaviry mají potlačenou expresi pozdních genů, která by mohla být spojena právě s methylací virové DNA.

Seznam použité literatury

- Aapola, U., Shibuya, K., Scott, H. S., Ollila, J., Vihinen, M., Heino, M., ... Peterson, P. (2000). *Isolation and Initial Characterization of a Novel Zinc Finger Gene, DNMT3L, on 21q22.3, Related to the Cytosine-5- Methyltransferase 3 Gene Family. Genomics* (Vol. 65).
- Adang, L., & Berger, J. (2015). Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *F1000Research*, 4.
- Amemiya, K., Traub, R., Durham, L., & Major, E. O. (1992). Adjacent nuclear factor-1 and activator protein binding sites in the enhancer of the neurotropic JC virus. A common characteristic of many brain-specific genes. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(20), 14204–11.
- Attwood, J. T., Yung, R. L., & Richardson, B. C. (2014). DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 59(2), 241–257.
- Balakrishnan, L., Gefroh, A., & Milavetz, B. (2010). Histone H4 lysine 20 mono- and tri-methylation define distinct biological processes in SV40 minichromosomes. *Cell Cycle*, 9(7), 1320–1332.
- Balakrishnan, L., & Milavetz, B. (2005). Programmed remodeling of hyperacetylated histone H4 and H3 organization on the SV40 genome during lytic infection. *Virology*, 334(1), 111–123.
- Balakrishnan, L., & Milavetz, B. (2006). Reorganization of RNA polymerase II on the SV40 genome occurs coordinately with the early to late transcriptional switch. *Virology*, 345(1), 31–43.
- Balakrishnan, L., & Milavetz, B. (2007). Histone hyperacetylation in the coding region of chromatin undergoing transcription in SV40 minichromosomes is a dynamic process regulated directly by the presence of RNA polymerase II. *Journal of Molecular Biology*, 365(1), 18–30.
- Balakrishnan, L., & Milavetz, B. (2008). Histone hyperacetylation during SV40 transcription is regulated by p300 and RNA polymerase II translocation. *North*, 371(4), 1022–1037.
- Baumann, P., & West, S. C. (1998). Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair. *Trends in Biochemical Sciences*, 23(7), 247–51.
- Behe, M., & Felsenfeld, G. (1981). Effects of methylation on a synthetic polynucleotide: the B-Z transition in poly(dG-m5dC).poly(dG-m5dC). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(3), 1619–23.
- Bellard, M., Oudet, P., Germond, J. E., & Chambon, P. (1976). Subunit Structure of Simian-Virus-40 Minichromosome, 553, 543–553. *Eur. J. Biochem.* 70,543-553.
- Bernier, G., Morin, M., & Marsolais, G. (1981). A generalized inclusion body disease in the budgerigar (*Melopsittacus undulatus*) caused by a papovavirus-like agent. *Avian Diseases*, 25(4), 1083–92.
- Black, J. C., Van Rechem, C., & Whetstine, J. R. (2012). Histone Lysine Methylation Dynamics: Establishment, Regulation, and Biological Impact. *Molecular Cell*, 48(4), 491–507.
- Bogdanović, O., & Veenstra, G. J. C. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*, 118(5), 549–65.
- Bozeman, L. H., Davis, R. B., Gaudry, D., Lukert, P. D., Fletcher, O. J., & Dykstra, M. J. (1981). Characterization of a papovavirus isolated from fledgling budgerigars. *Avian Diseases*, 25(4), 972–80.

- Buschhausen, G., Graessmann, M., & Graessmann, A. (1985).** Inhibition of herpes simplex thymidine kinase gene expression by DNA methylation is an indirect effect. *Nucleic Acids Research*, 13(15), 5503–13.
- Carmichael, G. G., & Benjamin, T. L. (1980).** Identification of DNA sequence changes leading to loss of transforming ability in polyoma virus. *The Journal of Biological Chemistry*, 255(1), 230–5.
- Carrozza, M. J., Li, B., Florens, L., Suganuma, T., Swanson, S. K., Lee, K. K., ... Workman, J. L. (2005).** Histone H3 Methylation by Set2 Directs Deacetylation of Coding Regions by Rpd3S to Suppress Spurious Intragenic Transcription. *Cell*, 123(4), 581–592.
- Coca-Prados, M., Vidali, G., & Hsu, M. T. (1980).** Intracellular forms of simian virus 40 nucleoprotein complexes. III. Study of histone modifications. *Journal of Virology*, 36(2), 353–60.
- Comb, M., & Goodman, H. M. (1990).** CpG methylation inhibits proenkephalin gene expression and binding of the transcription factor AP-2. *Nucleic Acids Research*, 18(13), 3975–82.
- Dahl, J., Chen, H. I., George, M., & Benjamin, T. L. (2007).** Polyomavirus small T antigen controls viral chromatin modifications through effects on kinetics of virus growth and cell cycle progression. *Journal of Virology*, 81(18), 10064–10071.
- Dailey, L., Colantuoni, V., Fenton, R. G., La Bella, F., Zouzias, D., Gattoni, S., & Basilico, C. (1982).** The evolution of polyoma-transformed rat cell lines during propagation in vitro. *Virology*, 116(1), 207–220.
- De Robertis, E. M., & Mertz, J. E. (1977).** Coupled transcription-translation of DNA injected into *Xenopus* oocytes. *Cell*, 12(1), 175–82.
- Devaiah, B. N., Case-Borden, C., Gegonne, A., Hsu, C. H., Chen, Q., Meerzaman, D., ... Singer, D. S. (2016).** BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 23(6), 540–548.
- Devaiah, B. N., Lewis, B. A., Cherman, N., Hewitt, M. C., Albrecht, B. K., Robey, P. G., ... Singer, D. S. (2012).** BRD4 is an atypical kinase that phosphorylates serine2 of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(18), 6927–32.
- Di Lorenzo, A., & Bedford, M. T. (2011).** Histone arginine methylation. *FEBS Letters*, 585(13), 2024–2031.
- DiMaio, D., & Nathans, D. (1982).** Regulatory mutants of simian virus 40: Effect of mutations at a T antigen binding site on DNA replication and expression of viral genes. *Journal of Molecular Biology*, 156(3), 531–548.
- Doskočil, J., & Šorm, F. (1962).** Distribution of 5-methylcytosine in pyrimidine sequences of deoxyribonucleic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects*, 55(6), 953–959.
- Dynan, W. S., & Tjian, R. (1983).** The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*, 35(1), 79–87.
- Eberharter, A., & Becker, P. B. (2002).** Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Reports*, 3(3), 224–9.
- Egli, A., Infanti, L., Dumoulin, A., Buser, A., Samaridis, J., Stebler, C., ... Hirsch, H. H. (2009).** Prevalence of polyomavirus BK and JC infection and replication in 400 healthy blood donors. *The Journal of Infectious Diseases*, 199(6), 837–46.

- Engel, S., Heger, T., Mancini, R., Herzog, F., Kartenbeck, J., Hayer, A., & Helenius, A. (2011).** Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *Journal of Virology*, 85(9), 4198–4211.
- Fang, C. Y., Shen, C. H., Wang, M., Chen, P. L., Chan, M. W. Y., Hsu, P. H., & Chang, D. (2015).** Global profiling of histone modifications in the polyomavirus BK virion minichromosome. *Virology*, 483, 1–12.
- Fogel, M., & Sachs, L. (1969).** The activation of virus synthesis in polyoma-transformed cells. *Virology*, 37(3), 327–334.
- Fogel, M., & Sachs, L. (1970).** Induction of virus synthesis in polyoma transformed cells by ultraviolet light and mitomycin C. *Virology*, 40(1), 174–177.
- Fradin, a, Manley, J. L., & Prives, C. L. (1982).** Methylation of simian virus 40 Hpa II site affects late, but not early, viral gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(17), 5142–5146.
- Freund, R., Bauer, P. H., Crissman, H. A., Bradbury, E. M., & Benjamin, T. L. (1994).** Host range and cell cycle activation properties of polyomavirus large T-antigen mutants defective in pRB binding. *Journal of Virology*, 68(11), 7227–34.
- Fried, M. (1965).** Cell-transforming ability of a temperature-sensitive mutant of polyoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 53(3), 486–91.
- Friez, M., Hermansen, R., & Milavetz, B. (1999).** Chromatin structure of the simian virus 40 late promoter: a deletional analysis. *Journal of Virology*, 73(3), 1990–7.
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., ... Paul, C. L. (1992).** A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(5), 1827–31.
- Gardner, S., Field, A., Coleman, D., & Hulme, B. (1971).** New human papovavirus (B.K.) isolated from urine after renal transplantation. *The Lancet*, 297(7712), 1253–1257.
- Germond, J. E., Hirt, B., Oudet, P., Gross-Bellark, M., & Chambon, P. (1975).** Folding of the DNA double helix in chromatin-like structures from simian virus 40. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), 1843–7.
- Gerritsen, M. E., Williams, A. J., Neish, A. S., Moore, S., Shi, Y., & Collins, T. (1997).** CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(7), 2927–32.
- Gosert, R., Kardas, P., Major, E. O., & Hirsch, H. H. (2010).** Rearranged JC virus noncoding control regions found in progressive multifocal leukoencephalopathy patient samples increase virus early gene expression and replication rate. *Journal of Virology*, 84(20), 10448–56.
- Götz, F., Schulze-Forster, K., Wagner, H., Kröger, H., & Simon, D. (1990).** Transcription inhibition of SV40 by in vitro DNA methylation. *BBA - Gene Structure and Expression*, 1087(3), 323–329.
- Graessmann, A., Sandberg, G., Guhl, E., & Graessmann, M. (1994).** Methylation of single sites within the herpes simplex virus tk coding region and the simian virus 40 T-antigen intron causes gene inactivation. *Molecular and Cellular Biology*, 14(3), 2004–2010.

- Graessmann, M., Graessmann, A., Wagner, H., Werner, E., & Simon, D. (1983).** Complete DNA methylation does not prevent polyoma and simian virus 40 virus early gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 80(21), 6470–4.
- Graessmann, M., Ziechmann, C., & Graessmann, A. (1984).** Methylation of the SV40 HpaII site does not affect late viral gene expression in microinjected tissue culture cells. *FEBS Letters*, 173(1), 151–154.
- Griffith, J. D. (1975).** Chromatin structure: deduced from a minichromosome. *Science (New York, N.Y.)*, 187(4182), 1202–3.
- Grinnell, B. W., Padgett, B. L., & Walker, D. L. (1983).** Comparison of infectious JC virus DNAs cloned from human brain. *Journal of Virology*, 45(1), 299–308.
- Guerin, J. L., Gelfi, J., Dubois, L., Vuillaume, A., Boucraut-Baralon, C., & Pingret, J. L. (2000).** A Novel Polyomavirus (Goose Hemorrhagic Polyomavirus) Is the Agent of Hemorrhagic Nephritis Enteritis of Geese. *Journal of Virology*, 74(10), 4523–4529.
- Harland, R. M., & Laskey, R. A. (1980).** Regulated replication of DNA microinjected into eggs of *Xenopus laevis*. *Cell*, 21(3), 761–71.
- Hartmann, G., & Krieg, A. M. (2000).** Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(2), 944–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10623843>
- Hattori, J., Carmichael, G. G., & Benjamin, T. L. (1979).** DNA sequence alterations in Hr-t deletion mutants of polyoma virus. *Cell*, 16(3), 505–13.
- Helmbold, P., Lahtz, C., Enk, A., Herrmann-Trost, P., Marsch, W. C., Kutzner, H., & Dammann, R. H. (2009).** Frequent occurrence of RASSF1A promoter hypermethylation and Merkel cell polyomavirus in Merkel cell carcinoma. *Molecular Carcinogenesis*, 48(10), 903–9.
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Kawai, T., Kaisho, T., Sato, S., Sanjo, H., ... Akira, S. (2000).** A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408(6813), 740–5.
- Hendzel, M. J., Wei, Y., Mancini, M. A., Van Hooser, A., Ranalli, T., Brinkley, B. R., ... Allis, C. D. (1997).** Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*, 106(6), 348–360.
- Hermansen, R., Sierra, M. A., Johnson, J., Friez, M., & Milavetz, B. (1996).** Identification of Simian virus 40 promoter DNA sequences capable of conferring restriction endonuclease hypersensitivity. *Journal of Virology*, 70(6), 3416–22.
- Hoelzer, K., Shackelton, L. A., & Parrish, C. R. (2008).** Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. *Nucleic Acids Research*, 36(9), 2825–2837.
- Howe, C. C., & Tan, K. B. (1977).** Nucleoprotein complexes from simian virus 40-infected monkey cells: association of viral DNA with histones and the major viral structural protein. *Virology*, 78(1), 45–56.
- Chang, C. F., Wang, M., Fang, C. Y., Chen, P. L., Wu, S. F., Chan, M. W. Y., & Chang, D. (2011).** Analysis of DNA methylation in human BK virus. *Virus Genes*, 43(2), 201–7.
- Chen, L., Mu, Y., & Greene, W. C. (2002).** Acetylation of RelA at discrete sites regulates distinct nuclear functions of NF-kappaB. *The EMBO Journal*, 21(23), 6539–48.

- Chestier, a, & Yaniv, M. (1979).** Rapid turnover of acetyl groups in the four core histones of simian virus 40 minichromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(1), 46–50.
- Jakobovits, E. B., Bratosin, S., & Aloni, Y. (1982).** Formation of a nucleosome-free region in SV40 minichromosomes is dependent upon a restricted segment of DNA. *Virology*, 120(2), 340–348.
- Jang, M. K., Mochizuki, K., Zhou, M., Jeong, H. S., Brady, J. N., & Ozato, K. (2005).** The bromodomain protein Brd4 is a positive regulatory component of P-TEFb and stimulates RNA polymerase II-dependent transcription. *Molecular Cell*, 19(4), 523–34.
- Jasencakova, Z., Meister, A., Walter, J., Turner, B. M., & Schubert, I. (2000).** Histone H4 acetylation of euchromatin and heterochromatin is cell cycle dependent and correlated with replication rather than with transcription. *The Plant Cell*, 12(11), 2087–100.
- Jeltsch, A. (2006).** Molecular Enzymology of Mammalian DNA Methyltransferases. In *DNA Methylation: Basic Mechanisms* (pp. 203–225).
- Jones, P. L., Veenstra, G. J., Wade, P. A., Vermaak, D., Kass, S. U., Landsberger, N., ... Wolffe, A. P. (1998).** Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nature Genetics*, 19(2), 187–91.
- Kallestad, L., Christensen, K., Woods, E., & Milavetz, B. (2014).** Transcriptional repression is epigenetically marked by H3K9 methylation during SV40 replication. *Clinical Epigenetics*, 6(1), 21.
- Kallestad, L., Woods, E., Christensen, K., Gefroh, A., Balakrishnan, L., & Milavetz, B. (2013).** Transcription and replication result in distinct epigenetic marks following repression of early gene expression. *Frontiers in Genetics*, 4(JUL), 1–7.
- Karlin, S., Doerfler, W., & Cardon, L. R. (1994).** Why is CpG suppressed in the genomes of virtually all small eukaryotic viruses but not in those of large eukaryotic viruses? *Journal of Virology*, 68(5), 2889–97.
- Keestra, A. M., de Zoete, M. R., Bouwman, L. I., & van Putten, J. P. M. (2010).** Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 185(1), 460–7.
- Keogh, M.-C., Kurdistani, S. K., Morris, S. A., Ahn, S. H., Podolny, V., Collins, S. R., ... Krogan, N. J. (2005).** Cotranscriptional Set2 Methylation of Histone H3 Lysine 36 Recruits a Repressive Rpd3 Complex. *Cell*, 123(4), 593–605.
- Khalili, K., White, M. K., Sawa, H., Nagashima, K., & Safak, M. (2005).** The agnoprotein of polyomaviruses: a multifunctional auxiliary protein. *Journal of Cellular Physiology*, 204(1), 1–7.
- Kim, S. Y., Woo, M. S., Kim, W. K., Choi, E. C., Henson, J. W., & Kim, H. S. (2003).** Glial cell-specific regulation of the JC virus early promoter by histone deacetylase inhibitors. *Journal of Virology*, 77(6), 3394–401.
- Kornberg, R. D. (1974).** Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science (New York, N.Y.)*, 184(4139), 868–71.
- Kornberg, R. D., & Thomas, J. O. (1974).** Chromatin structure; oligomers of the histones. *Science (New York, N.Y.)*, 184(4139), 865–8.
- Kouzarides, T. (2007).** Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705.
- Krieg, A. M. (2002).** CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annual Review of Immunology*, 20, 709–60.

- Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusser, S., Hornung, V., Bals, R., ... Hartmann, G. (2001).** Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *European Journal of Immunology*, 31(10), 3026–37.
- Kruh, J. (1981).** Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 42(2), 65–82.
- La Bella, F., & Vesco, C. (1980).** Late modifications of simian virus 40 chromatin during the lytic cycle occur in an immature form of virion. *J Virol*, 33(3), 1138–1150.
- La Bella, F., Vidali, G., & Vesco, C. (1979).** Histone acetylation in CV-1 cells infected with simian virus 40. *Virology*, 96(2), 564–575.
- Li, Q., Li, N., Hu, X., Li, J., Du, Z., Chen, L., ... Li, N. (2011).** Genome-wide mapping of DNA methylation in chicken. *PloS One*, 6(5), e19428.
- Liboi, E., & Basilico, C. (1984).** Inhibition of polyoma gene expression in transformed mouse cells by hypermethylation. *Virology*, 135(2), 440–51.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997).** Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648), 251–60.
- Manor, H. (1985).** Patterns of methylation of polyomavirus DNA in polyoma-transformed rat cells. *Journal of Virology*, 56(3), 734–42.
- Manor, H., & Kamen, R. (1978).** Polyoma Virus-Specific RNA Synthesis in an Inducible Line of Polyoma Virus-Transformed Rat Cells. *Journal of Virology*, 25(3), 719–729.
- Manor, H., Tomer, A., Baran, N., Neer, A., & Mendelsohn, E. (1983).** Organization and Replication of Chromosome-Associated Polyoma Virus DNA and Flanking Cellular Sequences in Polyoma-Transformed Rat Cells. In *Replication of Viral and Cellular Genomes* (pp. 69–91).
- Martin, J. D., King, D. M., Slauch, J. M., & Frisque, R. J. (1985).** Differences in regulatory sequences of naturally occurring JC virus variants. *Journal of Virology*, 53(1), 306–11.
- McCabe, M. T., Low, J. a, Imperiale, M. J., & Day, M. L. (2006).** Human polyomavirus BKV transcriptionally activates DNA methyltransferase 1 through the pRb/E2F pathway. *Oncogene*, 25(19), 2727–2735.
- McClelland, M. (1981).** The effect of sequence specific DNA methylation on restriction endonuclease cleavage. *Nucleic Acids Research*, 9(22), 5859–66.
- Mendelsohn, E., Baran, N., Neer, A., & Manor, H. (1982).** Integration site of polyoma virus DNA in the inducible LPT line of polyoma-transformed rat cells. *Journal of Virology*, 41(1), 192–209.
- Milavetz, B. (2004).** Hyperacetylation and differential deacetylation of histones H4 and H3 define two distinct classes of acetylated SV40 chromosomes early in infection. *Virology*, 319(2), 324–336.
- Milavetz, B. I. (2002).** SP1 and AP-1 elements direct chromatin remodeling in SV40 chromosomes during the first 6 hours of infection. *Virology*, 294(1), 170–9.
- Milavetz, B. I., & Balakrishnan, L. (2015).** Viral Epigenetic. *Methods Mol Biol.*, 1238, 569–596.
- Milavetz, B., Kallestad, L., Gefroh, A., Adams, N., Woods, E., & Balakrishnan, L. (2012).** Virion mediated transfer of SV40 epigenetic information. *Epigenetics*, 7(6), 528–534.
- Minarovits, J., Demcsák, A., Banati, F., & Niller, H. H. (2016).** Epigenetic Dysregulation in Virus-Associated Neoplasms. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 879, 71–90.

- Muller, U., Zentgraf, H., Eicken, I., & Keller, W. (1978).** Higher order structure of simian virus 40 chromatin. *Science*, 201(4354), 406–415.
- Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., & Bird, A. (1998).** Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature*, 393(6683), 386–9.
- Neish, A. S., Anderson, S. F., Schlegel, B. P., Wei, W., & Parvin, J. D. (1998).** Factors associated with the mammalian RNA polymerase II holoenzyme. *Nucleic Acids Research*, 26(3), 847–53.
- Ohashi, M., Taguchi, T., & Ikegami, S. (1978).** Aphidicolin: A specific inhibitor of DNA polymerases in the cytosol of rat liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 82(4), 1084–1090.
- Okano, M., Xie, S., & Li, E. (1998).** Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research*, 26(11), 2536–40.
- Oliveira, M. L., Brochado, S. M., & Sogayar, M. C. (1999).** Mechanisms of cell transformation induced by polyomavirus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira de Pesquisas Médicas E Biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et Al.]*, 32(7), 861–5.
- Pallas, D. C., Shahrik, L. K., Martin, B. L., Jaspers, S., Miller, T. B., Brautigan, D. L., & Roberts, T. M. (1990).** Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. *Cell*, 60(1), 167–176.
- Prendergast, G. C., & Ziff, E. B. (1991).** Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science (New York, N.Y.)*, 251(4990), 186–9. R
- Quint, A., & Cedar, H. (1981).** In vitro methylation of DNA with Hpa II methylase. *Nucleic Acids Research*, 9(3), 633–46.
- Razin, A. (1998).** CpG methylation , chromatin structure and gene silencing — a three-way connection. *The EMBO Journal*, 17(17), 4905–4908.
- Romagnoli, L., Wollebo, H. S., Deshmane, S. L., Mukerjee, R., Del Valle, L., Safak, M., ... White, M. K. (2009).** Modulation of JC virus transcription by C/EBPbeta. *Virus Research*, 146(1-2), 97–106.
- Roman, A. (1982).** Alteration in the Simian Virus 40 Maturation Pathway After Butyrate-Induced Hyperacetylation of Histones. *Microbiology*, 44(3), 958–962.
- Rungger, D., & Türlér, H. (1978).** DNAs of simian virus 40 and polyoma direct the synthesis of viral tumor antigens and capsid proteins in *Xenopus* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(12), 6073–7.
- Schaffhausen, B. S., & Benjamin, T. L. (1976).** Deficiency in histone acetylation in nontransforming host range mutants of polyoma virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(4), 1092–6.
- Stresemann, C., & Lyko, F. (2008).** Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International Journal of Cancer*, 123(1), 8–13.
- Sullivan, C. S., Grundhoff, A. T., Tevethia, S., Pipas, J. M., & Ganem, D. (2005).** SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature*, 435(7042), 682–6.
- Suzuki, T., Kimura, A., Nagai, R., & Horikoshi, M. (2000).** Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 5(1), 29–41.

- Taguchi, F., Kajioaka, J., & Miyamura, T. (1982).** Prevalence rate and age of acquisition of antibodies against JC virus and BK virus in human sera. *Microbiology and Immunology*, 26(11), 1057–64.
- Talasz, H., Lindner, H. H., Sarg, B., & Helliger, W. (2005).** Histone H4-lysine 20 monomethylation is increased in promoter and coding regions of active genes and correlates with hyperacetylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(46), 38814–22.
- Tooze, J., ed. (1980).** DNA Tumor Viruses: Molecular Biology of Tumor Viruses, 2nd Ed. (1980, Volume 10B).
- Toyooka, S., Carbone, M., Toyooka, K. O., Bocchetta, M., Shivapurkar, N., Minna, J. D., & Gazdar, A. F. (2002).** Progressive aberrant methylation of the RASSF1A gene in simian virus 40 infected human mesothelial cells. *Oncogene*, 21(27), 4340–4.
- Turner, B. M., & O'Neill, L. P. (1995).** Histone acetylation in chromatin and chromosomes. *Seminars in Cell Biology*, 6(4), 229–36.
- Upadhyay, M., & Vivekanandan, P. (2015).** Depletion of CpG dinucleotides in papillomaviruses and polyomaviruses: A role for divergent evolutionary pressures. *PLoS ONE*, 10(11), 1–16.
- Varshavsky, A. J., Bakayev, V. V., Chumackov, P. M., & Georgiev, G. P. (1976).** Minichromosome of simian virus 40: presence of histone H1. *Nucleic Acids Research*, 3(8), 2101–13.
- Verdone, L., Caserta, M., & Di Mauro, E. (2005).** Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochemistry and Cell Biology = Biochimie et Biologie Cellulaire*, 83(3), 344–53.
- Vesco, C., & Fantuzzi, L. F. (1982).** Different histone families in intracellular SV40 nucleoprotein complexes with respect to the acetylation turnover. *Virology*, 118(2), 389–400.
- White, M. K., Kaminski, R., Khalili, K., & Wollebo, H. S. (2014).** Rad51 activates polyomavirus JC early transcription. *PLoS ONE*, 9(10).
- White, M. K., Safak, M., & Khalili, K. (2009).** Regulation of gene expression in primate polyomaviruses. *Journal of Virology*, 83(21), 10846–10856.
- Winocour, E., Kaye, A. M., & Stollar, V. (1965).** Synthesis and transmethylation of DNA in polyoma-infected cultures. *Virology*, 27(2), 156–69.
- Wollebo, H. S., Bellizzi, A., Cossari, D. H., Safak, M., Khalili, K., & White, M. K. (2015).** Epigenetic regulation of polyomavirus JC involves acetylation of specific lysine residues in NF- κ B p65. *Journal of NeuroVirology*, 21(6), 679–687.
- Wollebo, H. S., Bellizzi, A., Cossari, D. H., Salkind, J., Safak, M., & White, M. K. (2016).** The Brd4 acetyllysine-binding protein is involved in activation of polyomavirus JC. *Journal of NeuroVirology*, 1–11.
- Wollebo, H. S., Melis, S., Khalili, K., Safak, M., & White, M. K. (2012).** Cooperative roles of NF- κ B and NFAT4 in polyomavirus JC regulation at the KB control element. *Virology*, 432(1), 146–154.
- Wollebo, H. S., Safak, M., Del Valle, L., Khalili, K., & White, M. K. (2011).** Role for tumor necrosis factor- α in JC virus reactivation and progressive multifocal leukoencephalopathy. *Journal of Neuroimmunology*, 233(1-2), 46–53.
- Wollebo, H. S., Woldemichaele, B., Khalili, K., Safak, M., & White, M. K. (2013).** Epigenetic regulation of polyomavirus JC. *Virology Journal*, 10(1), 264.

- Xu, Q., Zhang, Y., Sun, D., Wang, Y., & Yu, Y. (2007).** Analysis on DNA methylation of various tissues in chicken. *Animal Biotechnology*, 18(4), 231–41.
- Xu, Z., Gong, Q., Xia, B., Groves, B., Zimmermann, M., Mugler, C., ... Ma, D. (2009).** A role of histone H3 lysine 4 methyltransferase components in endosomal trafficking. *The Journal of Cell Biology*, 186(3), 343–53.
- Yang, Z., Yik, J. H. N., Chen, R., He, N., Jang, M. K., Ozato, K., & Zhou, Q. (2005).** Recruitment of P-TEFb for stimulation of transcriptional elongation by the bromodomain protein Brd4. *Molecular Cell*, 19(4), 535–45.
- Yeivin, A., & Razin, A. (1993).** Gene methylation patterns and expression. *EXS*, 64, 523–68.
- Yogo, Y., Kitamura, T., Sugimoto, C., Ueki, T., Aso, Y., Hara, K., & Taguchi, F. (1990).** Isolation of a possible archetypal JC virus DNA sequence from nonimmunocompromised individuals. *Journal of Virology*, 64(6), 3139–43.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., & Beppu, T. (1990).** Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(28), 17174–9.
- Yousoufian, H., Kazazian, H. H., Phillips, D. G., Aronis, S., Tsiftis, G., Brown, V. A., & Antonarakis, S. E. (1986).** Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature*, 324(6095), 380–2.